

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.

**Anwendbarkeit der Matrix Assisted Laser Desorption
Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)
für den Nachweis und die Differenzierung von *Leptospira* spp.
im Vergleich zum Multilocus Sequence Typing (MLST)**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Anna Lena Rettinger
aus Erlangen

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Martin Förster
Priv.-Doz. Dr. Stefan Bauersachs
Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke
Priv.-Doz. Dr. Cornelia Deeg

Tag der Promotion: 9. Februar 2013

Für meine Eltern

Auf seine eigene Art zu denken, ist nicht selbstsüchtig. Wer nicht auf seine Art denkt, denkt überhaupt nicht.

Oscar Wilde (1854-1900)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------------|--|----|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | LITERATURÜBERSICHT | 3 |
| 1 | <i>Leptospira</i> spp. | 3 |
| 1.1 | Taxonomie und Nomenklatur | 3 |
| 1.2 | Morphologische und mikrobiologische Eigenschaften von <i>Leptospira</i> spp. | 5 |
| 1.3 | Vergleichende Darstellung des Genoms von <i>Leptospira</i> spp. | 7 |
| 2 | Infektionszyklus von <i>Leptospira</i> spp. und Pathogenese der Krankheit | 8 |
| 3 | Immunantwort und Immunevasion | 10 |
| 4 | Epidemiologie | 13 |
| 4.1 | Epidemiologie des Menschen | 13 |
| 4.2 | Epidemiologie der Haussäugetiere | 16 |
| 5 | Leptospirose | 21 |
| 5.1 | Leptospirose des Menschen | 21 |
| 5.2 | Leptospirose der Haussäugetiere | 23 |
| 6 | Therapie und Prophylaxe | 25 |
| 6.1 | Therapie des Menschen | 25 |
| 6.2 | Therapie der Haussäugetiere | 26 |
| 6.3 | Prophylaxe | 28 |
| 7 | Diagnostik | 31 |
| 7.1 | Indirekter Erregernachweis | 31 |
| 7.2 | Direkter Erregernachweis | 33 |
| 8 | Massenspektrometrie als Nachweisverfahren | 36 |
| 8.1 | MALDI-TOF-MS-Technologie | 36 |
| 8.2 | Anwendung des MALDI-TOF MS für die Identifizierung von Bakterien | 38 |
| 8.3 | Phylogenetische Differenzierung von Bakterien mittels MALDI-TOF MS | 41 |
| 9 | Genotypisierung von <i>Leptospira</i> spp. mittels MLST | 42 |
| III. | Publikation | 45 |

| | |
|---|-----------|
| IV. DISKUSSION | 59 |
| 1 Die Notwendigkeit eines standardisierten Extraktionsprotokolls unter Berücksichtigung der Präparationsmethode und der Kulturbedingung | 60 |
| 2 Differenzierbarkeit von <i>Leptospira</i> spp. mittels MALDI-TOF MS und Analyse der differenzierenden Proteinpeaks | 62 |
| 3 Interpretation und Vergleichbarkeit der molekularbiologischen Sequenzierungsmethoden mit den Ergebnissen des MALDI-TOF MS | 66 |
| 4 Anwendbarkeit des MALDI-TOF MS für den Nachweis von Leptospiren und Ausblick | 68 |
| V. ZUSAMMENFASSUNG | 71 |
| VI. SUMMARY | 73 |
| VII. LITERATURVERZEICHNIS..... | 75 |
| VIII. ANHANG TABELLEN UND ABBILDUNGEN | 88 |
| IX. DANKSAGUNG..... | 95 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----------|---|
| AG | Antigen |
| AK | Antikörper |
| bp | Basenpaare |
| °C | Grad Celsius |
| CFU | colony-forming units |
| Da | Dalton |
| DFM | Dunkelfeldmikroskop |
| DIC | disseminierte intravasale Koagulopathie (disseminated intravascular coagulopathy) |
| DNA | desoxyribonucleic-acid |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| EMJH | Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris |
| ERU | equine rezidivierende Uveitis |
| FHR 1 | Factor H related protein 1 |
| HCCA | α -cyano-4-hydroxycinnamic acid |
| IE | internationale Einheiten |
| IL | Interleukin |
| KB | Kilobase |
| <i>L.</i> | <i>Leptospira</i> |
| Len | leptospiral endostatin-like lipoprotein |
| Lig | leptospiral immunoglobulin-like repeat protein |
| Lip | Lipoprotein |
| LPHS | hämorrhagisches pulmonales Syndrom (leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome) |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MALDI-TOF | matrix assisted laser desorption ionization-time of flight |
| MAT | Mikroagglutinations-Test (microscopic agglutination test) |
| Mb | Megabase |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |
| MLST | multilocus sequence typing |
| MSP | main spectral projection (Referenzspektrum) |

| | |
|------------|---|
| MS | Massenspektrometrie (mass spectrometry) |
| m/z | mass to charge ratio (Masse- zu Ladungsverhältnis) |
| NaCl | Natriumchlorid |
| OMP | outer membrane protein |
| PCA | principle component analyses |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PFGE | pulsed-field gel electrophoresis |
| pH | pH-Wert |
| p.i. | post infectionem |
| RFLP | restriction fragment length polymorphism |
| RNA | ribonucleic-acid |
| rRNA | ribosomale RNA |
| µm | Mikrometer |
| sp. | eine Spezies |
| spp. | mehrere Spezies |
| StIKo Vet. | ständige Impfkommission Veterinär |
| Th1 und 2 | T-Helferzellen 1 und 2 (Untergruppe der CD4-T-Zellen) |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor α |
| VNTR | variable number of tandem repeats |
| WHO | World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation) |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Aufbau und Bestandteile der Zellmembran von Leptospiren | 5 |
| Abbildung 2: Darstellung der drei zirkulären Chromosome von <i>L. biflexa</i> | 8 |
| Abbildung 3: Infektionszyklus pathogener <i>Leptospira</i> spp. | 10 |
| Abbildung 4: Mechanismen der Immunevasion pathogener Leptospiren vor dem Komplementsystem | 13 |
| Abbildung 5: Regionale Verbreitung der humanen Leptospirose in Deutschland | 15 |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung des zweiphasigen Verlaufs (early and late Phase) der humanen Leptospirose | 22 |
| Abbildung 7: Aufbau und Funktion des MALDI-TOF MS | 37 |
| Abbildung 8: Proteinspektren von drei verschiedenen Genospezies von <i>Leptospira</i> spp. | 38 |
| Abbildung 9: MSP Dendrogram pathogener <i>Leptospira</i> spp. | 42 |
| Abbildung 10: Vergleichende Darstellung von direkt aufgetragenen und extrahierten Proben von <i>Leptospira</i> spp. auf einem Target | 60 |
| Abbildung 11: Gegenüberstellung der Stammbäume des <i>rrs2</i> - und <i>secY</i> -Gens (MLST) | 67 |

Abbildungsverzeichnis Anhang

| | |
|---|----|
| Abbildung A 1: Agarosegel der PCR-Produkte für das <i>rrs2</i> -Gen | 94 |
|---|----|

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Einteilung von <i>Leptospira</i> spp. in 20 Genospezies | 4 |
| Tabelle 2: Häufig detektierte Serovare bei den Haussäugetieren | 19 |
| Tabelle 3: Antibiotisches Behandlungsschema für die kanine Leptospirose | 27 |
| Tabelle 4: Überblick über die in kommerziellen Vakzinen enthaltenen Serovare und die in Deutschland zugelassenen Impfstoffe | 30 |
| Tabelle 5: Interpretation verschiedener MAT Cut-off-Werte | 32 |
| Tabelle 6: Gebräuchliche Testsysteme für die Diagnose der Leptospirose | 35 |
| Tabelle 7: Verwendete Gene der beiden etablierten MLST-Systeme für die Genotypisierung von pathogenen Leptospiren | 43 |
| Tabelle 8: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Serovare für die differenzierende Proteinpeaks mittels ClinProTools detektiert wurden | 64 |
| Tabelle 9: Visuell detektierte Peak-Differenzen innerhalb der pathogenen Genospezies <i>L. borgpetersenii</i> und <i>L. interrogans</i> / <i>L. kirschneri</i> | 64 |

Tabellenverzeichnis Anhang

| | |
|---|----|
| Tabelle A 1: Lokalisation und Funktion einiger OMPs und anderer Membran-assoziiierter Proteine..... | 88 |
| Tabelle A 2: Überblick über die durchgeführten Teilprojekte am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie der LMU München und dem Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) Oberschleißheim..... | 91 |
| Tabelle A 3: Verwendete Stämme von <i>Leptospira</i> spp..... | 92 |
| Tabelle A 4: Verwendete Primersequenzen für das MLST | 93 |

I. EINLEITUNG

Die Leptospirose gilt als eine der am häufigsten auftretenden Zoonosen weltweit (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001). Trotz des globalen Vorkommens von *Leptospira* spp. ist der Nachweis des Erregers kompliziert (HARTSKEERL et al., 2011), da die Familie *Leptospiraceae* eine große Vielfalt von genetisch und antigenetisch unterschiedlichen Stämmen und Serovaren umfasst, die teilweise unzureichend oder nicht charakterisiert sind. Verfügbare diagnostische Testsysteme variieren stark in ihrer Qualität und der Verfügbarkeit in bestimmten Regionen. Der als Goldstandard geltende indirekte Nachweis mittels des Mikroagglutinations-Tests (MAT) zum Nachweis von Antikörpern (AK) ist aufwendig und oft schwer zu interpretieren (HARTSKEERL et al., 2011). Für die taxonomische Einteilung von Leptospiren existieren momentan zwei Klassifizierungssysteme, die nicht miteinander übereinstimmen (CERQUEIRA et al., 2009). Die serologische Einteilung basiert dabei auf nicht charakterisierten Antigen (AG)-Variationen der einzelnen Leptospirenserovare und wird in der serologischen Diagnostik verwendet. Die genetische, auf molekularbiologischen Typisierungsmethoden wie dem multilocus sequence typing (MLST) basierende Einteilung von *Leptospira* spp. wird dagegen häufig bei epidemiologischen Studien und für die Ermittlung phylogenetischer Verwandtschaften von Leptospiren angewendet (ROMERO et al., 2011). Für die Genotypisierung von *Leptospira* spp. sind momentan zwei MLST-Systeme etabliert, die eine Differenzierung von pathogenen Genospezies anhand der Analyse verschiedener Haushaltsgene ermöglichen (AHMED et al., 2006; THAIPADUNGPANIT et al., 2007). Eine weitere Differenzierung der Leptospirenstämme oder Leptospirenserovare, die nach der genetischen Einteilung verschiedenen Genospezies zugeordnet werden, gelingt mittels der MLST-Systeme jedoch nicht.

Innerhalb der letzten Jahre wird vermehrt die neue Technologie der matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) für die Differenzierung und Klassifizierung von Bakterien verwendet. MALDI-TOF MS erfasst stabil exprimierte Haushaltspoteine, die vor allem ribosomalen Proteinen zugeordnet werden können (WELKER (1) et al., 2011). Dabei wird nicht das Genom, sondern das Proteom der Zelle untersucht. Die analysierten Bakterienzellen werden anhand von Unterschieden in ihren individuellen Proteinprofilen charakterisiert und differenziert (SAUER et al., 2010; WIESER et al., 2011). Dabei können die Bakterien sicher auf Genus- oder Speziesebene identifiziert werden. Wie unter anderem für das Genus *Salmonella* gezeigt wurde, ist eine weitere Differenzierung auf Ebene der Subspezies möglich, wenn die Probe nach einem standardisierten Protokoll

präpariert wird (DIECKMANN et al., 2008). Im Vergleich zu herkömmlichen Genotypisierungsmethoden, die gegebenenfalls für jede Bakterienspezies neu optimiert werden müssen um eine bessere Differenzierung zu erhalten (CARBONNELLE et al., 2011), ist MALDI-TOF MS für verschiedene Bakterienspezies standardisiert anwendbar. Für die Klassifizierung von klinisch relevanten Bakterien konnten mit MALDI-TOF MS vergleichbare Ergebnisse zu molekularbiologischen Typisierungsmethoden erreicht werden (BENAGLI et al., 2011).

Aufgrund der oben beschriebenen Problematik in der systematischen Einteilung und Diagnostik war es Ziel dieser Arbeit, die Anwendbarkeit der MALDI-TOF-MS-Technologie für die Detektion und Differenzierung von *Leptospira* spp. im Vergleich zu anderen etablierten molekularbiologischen Methoden zu bewerten. Die Identität aller verwendeten Leptospirenstämme wurden mittels MLST und 16S-ribosomaler-RNA (rRNA) -Sequenzierung bestätigt. Um eine standardisierte Probenvorbereitung für die Messungen mittels MALDI-TOF MS zu gewährleisten, wurde ein Extraktionsprotokoll für in Kultur angereicherte Leptospiren etabliert. Eine Referenzdatenbank, die sowohl pathogene, intermediäre (Leptospiren unbekannter Pathogenität) als auch apathogene Stämme umfasst, wurde von 28 Leptospirenstämmen erstellt und durch anschließende Messungen mit definierten Laborstämmen sowie mit 16 Feldisolaten überprüft. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden mittels der statistischen Software ClinProTools und durch den visuellen Vergleich der Proteinspektren auf das Vorhandensein differenzierender Proteinpeaks untersucht. Dabei konnten innerhalb einzelner Genospezies für sieben Leptospirenstämme diskriminierende Proteinpeaks ermittelt werden. Die erstellten MLST- und 16S rRNA- Stammbäume sowie das Dendrogram der Proteinreferenzspektren stimmten miteinander überein.

Die in dieser Arbeit bewertete Anwendbarkeit der MALDI-TOF-MS-Technologie für die Differenzierung von *Leptospira* spp. stellt eine mit molekularbiologischen Methoden vergleichbare, sichere und reproduzierbare Nachweismethoden dar. Das etablierte Extraktionsprotokoll ist für die Speziesbestimmung von in Kultur angereicherten Leptospiren konzipiert und kann für die Identitätsprüfung von kultivierten Laborstämmen in der Forschung und der Diagnostik verwendet werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1 *Leptospira* spp.

1.1 Taxonomie und Nomenklatur

Nach dem ersten erfolgreichen Nachweis von Leptospiren in einer Gewebeprobe durch Stimson im Jahr 1907 gelang in den darauffolgenden Jahren die weitere funktionale Einteilung von Leptospiren in saprophytäre und pathogene Arten (CERQUEIRA et al., 2009). Bis 1989 wurde das Genus *Leptospira* in zwei Spezies unterteilt. Pathogene Stämme wurden der Spezies *Leptospira interrogans* sensu lato zugeordnet. Aus der Umwelt isolierte saprophytäre Arten gliederte man dagegen in die Spezies *Leptospira biflexa* sensu lato ein (LEVETT, 2001). Leptospiren dieser zwei Spezies unterscheiden sich sowohl morphologisch, als auch durch ihre unterschiedlichen Nahrungsansprüche in der Kultur. Saprophytäre Arten wachsen bereits bei 13 °C, während pathogene Arten höherer Temperaturen benötigen und eine längere Generationszeit aufweisen. Zugabe von 8-Azaguanin, einem Purinanalogum zu Guanin, hemmt das Wachstum von pathogenen Arten, nicht aber das von saprophytären Leptospiren. Die Ausbildung von sphärischen Zellen in 1-molarem Natriumchlorid (NaCl) wird nur bei pathogenen Stämmen beobachtet (TOYOKAWA et al., 2011). Innerhalb der beiden Spezies werden Leptospiren in zahlreiche Serovare unterteilt. Die Einteilung beruht dabei auf definierten Agglutinationsreaktionen mit homologen Antigenen (GREENE, 2012; LEVETT, 2001). Grundlage hierfür sind Strukturunterschiede im Kohlenhydratanteil der Lipopolysaccharide (LPS), die in der äußeren Membran der Leptospiren lokalisiert sind (CERQUEIRA et al., 2009). Antigenetisch verwandte Arten werden auf Grund ähnlicher Reaktionen im MAT in Serogruppen zusammengefasst, wobei ein Serovar verschiedenen Serogruppen zugeordnet werden kann. Insgesamt werden mehr als 250 Serovare der Spezies *L. interrogans* sensu lato und 60 derzeit bekannte Serovare der Spezies *L. biflexa* sensu lato zugeteilt. Für pathogene Arten sind insgesamt 26 Serogruppen beschrieben (TOYOKAWA et al., 2011). Durch die Anwendung molekularbiologischer Untersuchungen kam es zu einer Neuordnung der taxonomischen Einteilung des Genus *Leptospira*. Basierend auf desoxyribonucleic-acid- (DNA) -Hybridisierungsstudien wurden die Serovare verschiedenen Genospezies zugeordnet. Die Einteilung der Genospezies basierte dabei auf dem Grad der DNA-Verwandtschaft der Serovare (BRENNER et al., 1999). Heute werden auf der Grundlage verschiedener DNA-Hybridisierungsstudien derzeit 20 Genospezies für das Genus *Leptospira*

beschrieben (Tabelle 1) (ADLER et al., 2010). Basierend auf der genetischen Variabilität eines Serovars kann dieses verschiedenen Genospezies zugeteilt werden. Neben der Zuordnung der Stämme zu bestimmten Genospezies kann, bei der genetischen Einteilung, auf der Basis der 16S-rRNA-Gensequenzierung das Genus in pathogene, intermediäre und apathogene Arten eingeteilt werden. Diese Einteilung wird bis heute verwendet (MOREY et al., 2006). Die genetische und die traditionelle, serologische Klassifizierung stimmen nicht miteinander überein (BRENNER et al., 1999; YASUDA et al., 1987). Trotz dieser geringen Übereinstimmung beider Klassifizierungssysteme werden die serologische und die genetische Einteilung parallel verwendet (CERQUEIRA et al., 2009).

Tabelle 1: Einteilung von *Leptospira* spp. in 20 Genospezies

| Genospezies | Einteilung basierend auf der 16S rRNA |
|---|---------------------------------------|
| <i>Leptospira interrogans</i> (sensu stricto) | pathogen |
| <i>Leptospira kirschneri</i> | pathogen |
| <i>Leptospira noguchii</i> | pathogen |
| <i>Leptospira borgpetersenii</i> | pathogen |
| <i>Leptospira weilii</i> | pathogen |
| <i>Leptospira santarosai</i> | pathogen |
| <i>Leptospira alexanderi</i> | pathogen |
| <i>Leptospira alstonii</i> | pathogen |
| <i>Leptospira wolffii</i> | intermediär |
| <i>Leptospira licerasiae</i> | intermediär |
| <i>Leptospira inadai</i> | intermediär |
| <i>Leptospira fainei</i> | intermediär |
| <i>Leptospira broomii</i> | intermediär |
| <i>Leptospira kmetyi</i> | saprophytär |
| <i>Leptospira wolbachii</i> | saprophytär |
| <i>Leptospira meyeri</i> | saprophytär |
| <i>Leptospira biflexa</i> (sensu stricto) | saprophytär |
| <i>Leptospira vanthielii</i> | saprophytär |
| <i>Leptospira terpstrae</i> | saprophytär |
| <i>Leptospira yanagawae</i> | saprophytär |

Modifiziert nach Adler und Cerqueira (ADLER et al., 2010; CERQUEIRA et al., 2009)

1.2 Morphologische und mikrobiologische Eigenschaften von *Leptospira* spp.

Leptospiren sind fadenförmige, helikal gewundene, gramnegative Bakterien (CHAKRABORTY et al., 2011; GREENE, 2012). Die Länge des Bakteriums variiert je nach Serovar zwischen 10 bis 20 µm, ihr Durchmesser liegt bei 0,10 bis 0,15 µm (CHAKRABORTY et al., 2011). Typisch für Leptospiren ist die Form ihrer Zellenden, die häufig als Kleiderbügelform beschrieben wird und sie morphologisch von anderen Spirochäten abgrenzt (KO et al., 2009). Der Protoplasmazyylinder der Bakterienzelle ist von einer Zellwand umgeben, die in ihrem Aufbau dem der gramnegativen Bakterien ähnelt (HAAKE et al., 2010). Die Zellwand besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran (Abbildung 1) (KO et al., 2009). Die innere Membran ist eng mit der Peptidoglykanschicht verbunden. Um diese windet sich ein zentrales Axialfilament, das aus zwei periplasmatischen Flagellen besteht (GREENE, 2012). Zwischen den zwei Membranen liegt der periplasmatische Spalt, in dem die beiden periplasmatischen Flagellen an den zwei Enden der Bakterienzelle verankert sind und die aktive Fortbewegung der Leptospiren ermöglichen.

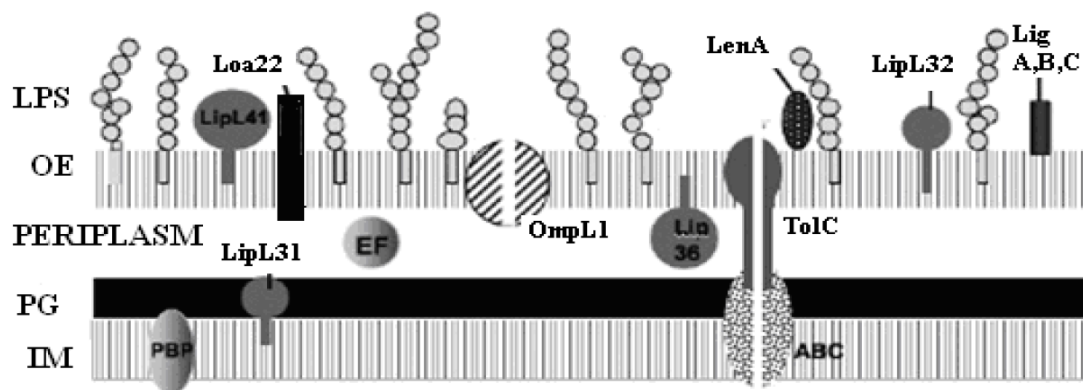


Abbildung 1: Aufbau und Bestandteile der Zellmembran von Leptospiren

Modifiziert nach Cinco (CINCO, 2010)

Abkürzungen der wichtigsten Membranbestandteile:

OE: äußere Membran; **IM:** innere Membran; **PG:** Peptidoglykanschicht; **LPS:** Lipopolysaccharide; **EF:** periplasmatisches Flagellum; **PBP:** Penicillin bindendes Protein; **TolC:** ABC-Transporter gekoppeltes Efflux-System für den Transport von Stoffen aus dem Zytoplasma; **OmpL1:** temperaturabhängiges Porin der äußeren Membran; **LipL:** Lipoproteine; **LenA:** leptospiral endostatin-like lipoprotein A; **Loa22:** Oberflächen Protein, einzig bekannter Virulenzfaktor im Sinne der Henle-Koch-Postulate; **Lig A-C:** leptospiral immunoglobulin-like repeat proteins A-C

Die genauen Funktionen der wichtigsten Membranbestandteile sind in der Tabelle A1 beschrieben.

In die Membran sind verschiedene integrale Membranproteine und outer membrane proteins (OMPs) - vorwiegend Lipoproteine - eingelagert, die für den Stoffwechsel und für die Pathogenität der Serovare verantwortlich sind (Tabelle A1, Anhang) (KO et al., 2009). Eine Vielzahl an amphipatischen, transmembranösen OMPs, die teilweise Homologien zu denen gramnegativer Bakterien aufweisen, sind beschrieben (HAAKE et al., 2010). Neben auch bei *Borrelia* spp. vorkommenden Lipoproteinen, besitzen Leptospiren im Gegensatz zu Spirochäten wie *Treponema pallidum* und *Borrelia* spp. ein LPS (CULLEN et al., 2004; HAAKE et al., 2010). Der Aufbau des LPS ähnelt dem der gramnegativen Bakterien mit einem Lipid A Anteil, mit dem es in der Membran verankert ist, dem Core bestehend aus Polysacchariden, sowie der O-spezifischen Polysaccharidkette (O-AG), die für die Antigenvariabilität der einzelnen Serovare verantwortlich ist. Verglichen mit dem Aufbau des LPS von *Escherichia coli* unterscheidet sich das LPS von Leptospiren jedoch in drei Merkmalen. Dabei ist die zweite Fettsäure ungesättigt, die Länge der Fettsäurenkette variiert und der Lipid A Anteil ist methyliert (WERTS, 2010).

Leptospiren können in flüssigen oder semisoliden Medien kultiviert werden. Optimal wachsen Leptospiren bei aeroben Bedingungen und Temperaturen zwischen 28 °C bis 30 °C. Dem Medium müssen langkettige Fettsäuren zugesetzt sein, die die Leptospiren durch β -Oxidation als Kohlenhydrat- und Energiequelle nutzen. Essentiell sind auch Vitamin B1 und Vitamin B12 sowie Ammoniumsalze. Das am häufigsten verwendete Medium ist das kommerziell erhältliche Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris (EMJH) Medium (EVANGELISTA et al., 2010). Neben bovinem Serumalbumin basiert das Medium auf Ölsäure und Polysorbaten (Tween). Das Wachstum anspruchsvoller Stämme kann durch den Zusatz von Pyruvaten oder Kaninchenserum verbessert werden. Durch Zugabe von 1,5 % Agar zu dem Medium kann nach einigen Tagen eine Wachstumszone als Trübung unterhalb der Mediumsgrenze beobachtet werden (ADLER et al., 2010). Dieses als „Dinger’s Disk“ beschriebene Phänomen entsteht durch die Anreicherung der aeroben Bakterien direkt unterhalb des Flüssigkeitsspiegels (LE FEBVRE et al., 1985). In Kultur wachsende Leptospiren müssen kontinuierlich in frisches Medium subkultiviert werden (ADLER et al., 2010). Zusätzlich sollten sie regelmäßig auf Teilung und Vitalität im Dunkelfeldmikroskop überprüft werden. Dabei ist eine Dichte von 1×10^4 bis 1×10^5 Leptospiren/ml nötig, um mikroskopisch ein Bakterium pro Gesichtsfeld detektieren zu können (GREENE, 2012; TOYOKAWA et al., 2011). Bei Anzüchtung von Isolaten aus klinischen Proben sollte 5-Fluorouracil und/oder Antibiotika wie Neomycin oder Rifampicin zugesetzt werden, um die Begleitflora zu hemmen. Da Leptospiren mit einer Generationszeit von ungefähr 20 Stunden zu den langsam wachsenden Bakterien zählen,

können diagnostische Kulturen mit Blut oder Urin erst nach 13 Wochen mit hoher Wahrscheinlichkeit als negativ angesehen werden (TOYOKAWA et al., 2011).

1.3 Vergleichende Darstellung des Genoms von *Leptospira* spp.

Für Leptospiren wurden bisher sechs komplette Genomsequenzen von pathogenen und apathogenen Spezies veröffentlicht. Die Genospezies *L. interrogans* wurde anhand der zwei eng verwandten Serovare Copenhageni und Lai beschrieben (NASCIMENTO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2004). *L. borgpetersenii* Serovar Hardjo Stamm L550 und Stamm JB197 folgten im Jahr 2006 (BULACH et al., 2006). Saprophytäre Arten sind durch die zwei Stämme *Leptospira biflexa* Serovar Patoc Stamm Patoc I (Paris) und Stamm Patoc I (Ames) vertreten (PICARDEAU et al., 2008). Leptospiren besitzen im Gegensatz zu Treponemen und Borrelien keine Plasmide, sondern zwei zirkuläre, in sich geschlossene Chromosome. *L. biflexa* weist ein drittes, zusätzliches 74 Kilobasen (kb) großes Chromosom auf, das den pathogenen Leptospiren fehlt (Abbildung 2). Viele Gene, die für das Überleben in der Umwelt notwendig sind, weisen Punktmutation bei *L. borgpetersenii* auf. Zum Beispiel sind im Genom von *L. interrogans* zwei Gene vorhanden, die den Genen *devR* und *DevS* von *Myxococcus xanthus* ähneln und wichtig für das Überleben bei schlechten Umweltbedingungen wie Nahrungsmangel sind. Diese beiden Gene fehlen jedoch im Genom von *L. borgpetersenii*. Durch diese funktionelle Veränderung ist diese Genospezies nicht mehr fähig, in der freien Umwelt zu überleben. Daher ist der Übertragungsweg dieser Leptospirenspezies an einen strikten Wirt-Wirt-Zyklus gebunden (BULACH et al., 2006). Dagegen besitzt *L. biflexa* auf seinem dritten Chromosom viele Haushaltsgene, die für das Überleben in der Umwelt notwendig sind. Orthologe Gene findet man zwar auch auf dem Chromosom 1 der pathogenen Spezies (ADLER et al., 2010), dennoch fehlen *L. interrogans* und *L. borgpetersenii* circa ein Drittel der Gene, die bei *L. biflexa* vertreten sind (ADLER et al., 2011). Die Genomgröße des Leptospiren-Genoms variiert deshalb deutlich zwischen 3,9 und 4,6 Megabasen (Mb) und der Gehalt an G (Guanin) + C (Cytosin) liegt in Abhängigkeit von der Spezies zwischen 35 mol % bis 41 mol %. Gemeinsam sind allen Leptospiren 2052 Gene, die als sogenanntes Kerngenom bezeichnet werden. Zudem konnten die für die Synthese des LPS, für die leptospiral immunoglobulin-like repeat proteins (Lig Proteine), die leptospiral endostatin-like lipoproteins (Len Proteine) und einige Lipoproteine (Lip) pathogener *Leptospira* spp. die kodierenden Gene bisher identifiziert werden (CULLEN et al., 2004; STEVENSON et al., 2007).

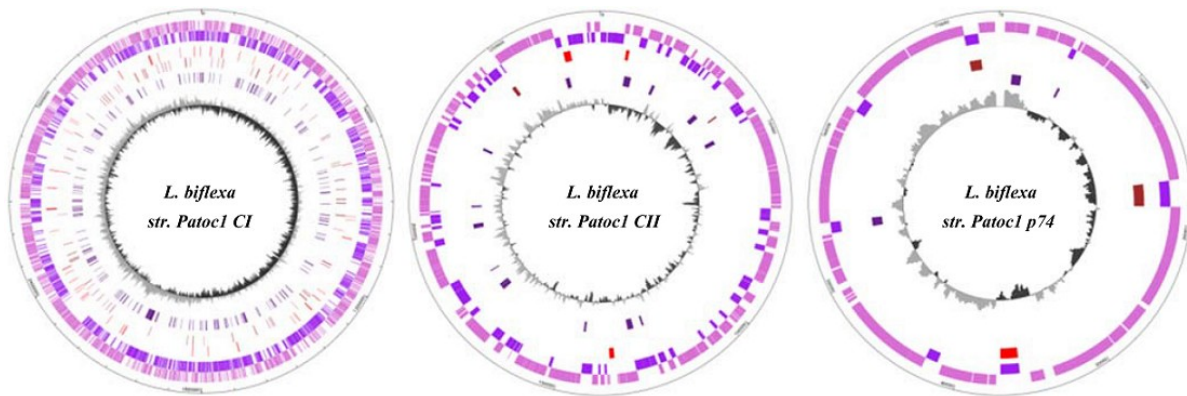


Abbildung 2: Darstellung der drei zirkulären Chromosome von *L. biflexa*

Nach Picardeau et al. (PICARDEAU et al., 2008)

Die Farben stellen verschiedene Gene der Genospezies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* und *L. biflexa* dar.

Rosa: spezifische Gene für *L. biflexa*; **Dunkelviolett:** universell vorkommende Gene bei *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* und *L. kirschneri*; **Rot:** spezifische Gene für *L. biflexa* und *L. borgpetersenii*; **Braun:** spezifische Gene für *L. biflexa* und *L. interrogans*; **Grau:** positiver GC Skew; **schwarz:** negativer GC Skew;

2 Infektionszyklus von *Leptospira* spp. und Pathogenese der Krankheit

Bei über 180 verschiedenen Tierarten gelang der erfolgreiche Nachweis und die Isolierung von Leptospiren (GUERRA, 2009). Obwohl der Erreger auch bei Vögeln detektiert werden konnte und Insekten als mögliche Infektionsquelle diskutiert wurden, spielen nur Säugetiere eine Rolle bei der Übertragung und Verbreitung (BABUDIERI, 1958). Dabei können ein oder gleichzeitig mehrere Serovare an bestimmte Säugetierspezies adaptiert sein. Diese Tiere fungieren als sogenannte Reservoirwirte und scheiden Leptospiren mit dem Urin in die Umgebung aus ohne klinisch zu erkranken. In Populationen, in denen Leptospiren endemisch sind, kommen Individuen meist schon sehr früh in den Kontakt mit dem Erreger. Übersteht das junge Tier die akute Infektion, kann es ein chronisches Trägerstadium entwickeln (Abbildung 3) (GUERRA, 2009; LEVETT, 2001). Dabei siedeln sich die Leptospiren im proximalen renalen Tubulussystem der Niere an, in dem sie sich replizieren können, und werden so für mehrere Monate oder Jahre mit dem Urin ausgeschieden. Als Reservoirwirte gelten vor allem kleine Nagetiere, die als Hauptinfektionsquelle für den Menschen, Haus- und Nutztiere angesehen werden (ADLER et al., 2010; GREENE, 2012). Kommt es zu einer Infektion mit einem nicht wirtsadaptierten Serovar, können auch Reservoirwirte zu sogenannten Zufallswirten werden und klinisch schwer erkranken (LEVETT, 2001). Alle Säugetiere, nicht aber der Mensch,

können ein chronisches Trägerstadium ausbilden und so als Reservoirwirte den Erreger ausscheiden und verbreiten (Abbildung 3). Die molekularen Mechanismen der serovar-abhängigen Adaptation an bestimmte Säugetierspezies sind nicht bekannt (ADLER et al., 2010). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei einer Infektion mit pathogenen Leptospiren die Immunantwort von Mäusen und Menschen auf unterschiedlichen Mechanismen beruht und das humane Immunsystem nicht fähig ist, Leptospiren effektiv zu eliminieren (siehe Punkt 3 Immunantwort und Immunevasion) (EVANGELISTA et al., 2010). Die Ausscheidung mit dem Urin kann kontinuierlich oder intermittierend erfolgen. Relevant ist hierbei der pH-Wert (pH) des Urins. Leptospiren werden mit dem alkalischen Harn der Pflanzenfresser in großen Mengen ausgeschieden. Der relativ niedrige Urin pH der Fleischfresser verringert die Menge der ausgeschiedenen Leptospiren (ADLER et al., 2010). *Leptospira* spp. können außerhalb der Wirte in feuchter Umgebung für mehrere Monate überleben. Optimale Bedingungen sind Temperaturen zwischen 28 °C bis 38 °C bei einem pH von 6,2 bis 8,0. Ein hoher Salzgehalt oder niedrige pH-Werte inhibieren das Überleben des Erregers in der Umwelt und im Wasser (GUERRA, 2009). Warme stehende oder langsam fließende Gewässer mit Temperaturen zwischen 0 °C bis 25 °C stehen bei der indirekten Übertragung im Vordergrund. Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes setzen die Überlebensfähigkeit des Bakteriums herab. Daher treten Infektionen vermehrt im Spätsommer bis zum frühen Herbst auf. Insbesondere wenn schwere Regenfälle, wie sie in subtropischen Regionen vorkommen, die Verbreitung des Pathogens begünstigen (GOLDSTEIN, 2010). Fehlende Abwassersysteme und Entsorgungssysteme für Müll spielen in urbanen Regionen eine Rolle (SOCOLOVSKI et al., 2011). Leptospiren können durch intakte Schleimhäute, wie die Konjunktiven, und Hautverletzungen in den Organismus eindringen (LEVETT, 2001). Über die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen wie Leptospiren in den Organismus gelangen und sich vermehren können ist jedoch wenig bekannt (PALANIAPPAN et al., 2007). Pathogene Leptospiren besitzen die Fähigkeit an Wirtszellen und an Bestandteile der extrazellulären Matrix zu adherieren. Zusätzlich kann der Erreger aktiv Zellwände durchdringen ohne diese zu schädigen. Mehr als 200 OMPs sind beschrieben, die für die Pathogenität verantwortlich sein können (CINCO, 2010). Bestimmte Membranproteine der äußeren Zellmembran werden nur während einer Infektion vermehrt exprimiert, und fungieren so als Virulenzfaktoren (Tabelle A1, Anhang). Hierzu zählen unter anderem LipL32, Loa22, LigA, LruA und LruB. Durch Fibronektin-bindende Proteine und Lig-Proteine der äußeren Zellwand können pathogene Stämme an Wirtszellen adhären (PALANIAPPAN et al., 2007). Hohe Temperaturen und ein niedriger Eisengehalt spiegeln die Verhältnisse im Wirtsgewebe bei einer Infektion wieder. Einige

OMPS, wie LipL 36, werden bei diesen Bedingungen nicht exprimiert. Man nimmt daher an, dass die verminderte Expression bestimmter Gene während einer Infektion eine Möglichkeit ist, wie sich Leptospiren der Immunantwort des Wirtes entziehen können (ADLER et al., 2011).

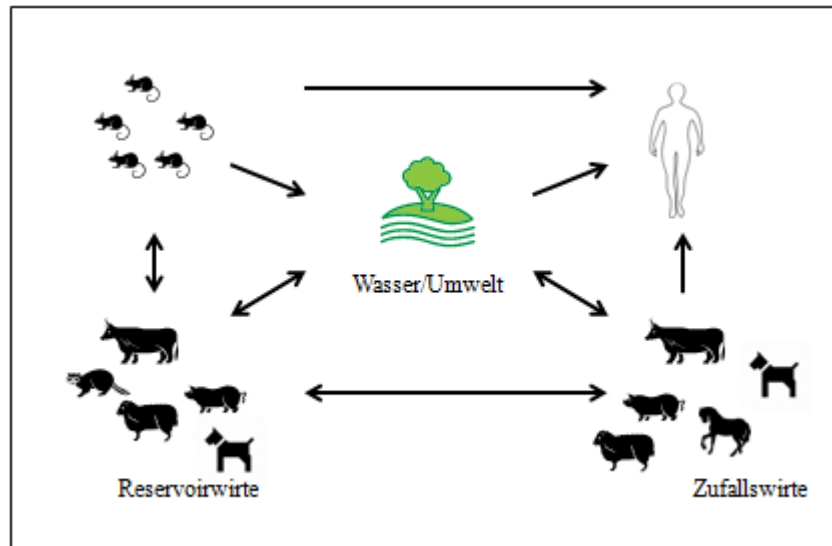


Abbildung 3: Infektionszyklus pathogener *Leptospira* spp.

3 Immunantwort und Immunevasion

Eine Infektion mit *Leptospira* spp. kann sowohl zu einer symptomlosen, chronischen Infektion, als auch zu schweren klinischen Erkrankungen führen (BHARTI et al., 2003; GREENE, 2012; LEVETT, 2001). Über die zugrunde liegenden Mechanismen der Immunevasion und folgender Persistenz in der Niere ist noch wenig bekannt. Da Leptospiren zu den extrazellulären Erregern zählen, spielt bei der erfolgreichen Abwehr einer Infektion die Bildung spezifischer AK und die Aktivierung des Komplementsystems eine essentielle Rolle (FRAGA et al., 2011). Sowohl IgG- als auch IgM-AK, die hauptsächlich gegen das LPS von Leptospiren gerichtet sind, können nach einer überstandenen schweren klinischen Leptospirose noch bis zu sechs Jahre beim Menschen nachgewiesen werden (CUMBERLAND et al., 2001). In der Gegenwart von spezifischen AK werden Leptospiren *in vitro* und *in vivo* erfolgreich von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten phagozytiert. Aufgrund der Serovarspezifität des LPS induzieren die gebildeten AK jedoch nur eine serovargebundene Immunität (ADLER et al., 2010). Die Bildung spezifischer Immunglobuline während einer Leptospireninfektion basiert bei Mäusen und dem Menschen auf unterschiedlichen Mechanismen. Dabei verläuft eine Infektion bei

Mäusen im Gegensatz zum Menschen meist symptomlos und die Tiere entwickeln ein persistentes Trägerstadium. Im Allgemeinen wird das LPS gramnegativer Bakterien durch Makrophagen über den sogenannten Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4) erkannt. Die darauffolgende Aktivierung des Immunsystems führt zur Bildung spezifischer AK (EVANGELISTA et al., 2010; WERTS, 2010). Bei der Abwehr von Leptospiren spielt hingegen der TLR2 und der TLR4 Rezeptor eine Rolle. Beim Menschen wird das LPS nur durch den TLR2 Rezeptor erkannt. Mäuse erkennen das LPS dagegen über den TLR2 und TLR4 Rezeptor (WERTS et al., 2001; WERTS, 2010). Die Erkennung des LPS durch den TLR4 Rezeptor ist essentiell für die rechtzeitige Produktion von IgM-AK durch die B-Zellen und der damit verbundenen Elimination des Erregers. Doppel knockout-Mäuse, denen beide TLR-Rezeptoren fehlten, starben nach einer Infektion mit *L. interrogans* Serovar Copenhageni an akutem Nieren- und Leberversagen (CHASSIN et al., 2009). Die Unfähigkeit humaner Makrophagen, Leptospiren über den TLR4 Rezeptor zu erkennen, wird auf den einzigartigen Aufbau des Lipid A Teils des Leptospiren-LPS zurückgeführt (siehe 1.2) (EVANGELISTA et al., 2010; FRAGA et al., 2011). TLR4 scheint daher essentiell für die effektive Immunantwort durch das humorale Immunsystem zu sein und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Ausbildung chronisch latenter Infektionen bei Trägartieren (PALANIAPPAN et al., 2007). Zwar können Makrophagen Leptospiren phagozytieren, die Effektivität mit der Leptospiren innerhalb der Makrophagen abgetötet werden unterscheidet sich jedoch bei murinen und humanen Zelllinien. Li et al. konnten zeigen, dass sowohl murine, als auch humane Makrophagen Leptospiren aufnehmen können, die Inaktivierung jedoch nur bei murinen Zelllinien erfolgt. In murinen Makrophagen liegen die Leptospiren in den Phagolysosomen und können dort inaktiviert werden. Bei humanen Makrophagen liegt der Erreger dagegen im Zytosol, in dem er sich repliziert. Die anschließende Apoptose der Makrophagen führt zu einer Freisetzung der lebenden Leptospiren (LI et al., 2010). Der genaue molekulare Mechanismus ist hierfür noch nicht bekannt.

Die Freisetzung immunmediierter Mediatoren und die anschließende Entzündungsreaktion nach AG-Kontakt dienen normalerweise in der akuten Phase einer Infektion der Elimination des Erregers (WANG et al., 2012). Schwere klinische Verlaufsformen der Leptospirose werden mit dem übermäßigen Anstieg bestimmter proinflammatorischer Mediatoren assoziiert, die bei einer Infektion mit Leptospiren vermehrt im Serum detektiert werden (VERNEL-PAUILLAC et al., 2010). Neben verschiedenen Interleukinen (IL) werden vor allem Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und IL-6 mit dem Auftreten schwerer klinischer Verlaufsformen in Verbindung gebracht (TAJIKI et al., 1996; VERNEL-PAUILLAC et al., 2010). Die Freisetzung von

Mediatoren im Wirt wird dabei von verschiedenen Komponenten der Bakterienzelle pathogener Leptospiren induziert. Dazu zählt vor allem das Leptospiren-LPS, das bei humanen Makrophagen eine TLR2 abhängige Freisetzung von Zytokinen wie IL-8 und TNF- α verursacht (WERTS et al., 2001). Die Entzündungsreaktion in den proximalen Tubuleszellen der Niere ist ebenfalls TLR2 vermittelt. Daneben spielen weitere OMPS wie LipL32 eine Rolle bei der Freisetzung von TNF- α (YANG et al., 2006). In einer neuen Studie wurde gezeigt, dass die nur im Genom pathogener Leptospiren kodierten Gene für die Hämolysine *Sph1*, *Sph2*, *Sph3*, *HlpA* und *TlyA* bei murinen und humanen Makrophagen TLR2 und TLR4 abhängig zu einer Freisetzung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α führen. Dabei werden die Gene erst bei dem Kontakt zu Wirtszellen vermehrt exprimiert. Hämolysine pathogener *Leptospira* spp. fungieren daher als Stimulatoren bei der Auslösung einer proinflammatorischen Reaktion im Wirt und sind somit an der Entstehung klinischer Symptome beteiligt (WANG et al., 2012). Ob weitere Bestandteile pathogener Leptospiren oder die Freisetzung bestimmter Mediatoren für die Schwere der Erkrankung, oder die Ausbildung einer chronischen Infektion verantwortlich sind, ist noch nicht bekannt.

Darüber hinaus besitzen pathogene Leptospirenstämme im Vergleich zu apathogenen Leptospiren Mechanismen, die es ihnen ermöglichen, sich der Inaktivierung durch das Immunsystem zu entziehen. Pathogene Leptospiren sind hoch invasiv und heften sich, im Gegensatz zu saprophytären Leptospiren, *in vitro* an Zellen an und dringen in diese ein (LIU et al., 2007). Durch diese Mechanismen sind pathogene Arten dazu befähigt, in der frühen Phase der Infektion, sich rasch in verschiedene Organe wie der Niere oder der Leber zu disseminieren, ohne dass sie dabei vom Komplementsystem erkannt und anschließend phagozytiert werden (CINCO, 2010). Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen Immunsystems und spielt bei der Abwehr in der frühen Phase einer Infektion eine Rolle. LenA und LenB, zwei Membranproteine pathogener Stämme (Abbildung 1; Tabelle A1, Anhang), besitzen unter anderem die Fähigkeit, Faktor H und das Factor H related protein 1 (FHR-1) des Komplementsystems zu binden. Faktor H ist ein Regulator innerhalb des alternativen Aktivierungsweges des Komplementsystems. Die Bindung dieses Faktors an die Oberfläche pathogener Leptospiren führt zur Hemmung der Komplementkaskade (Abbildung 4). Zusätzlich können pathogene Leptospiren den klassischen Aktivierungsweg der Komplementkaskade unterbrechen, indem sie den Regulator C4BP binden und dadurch inaktivieren (FRAGA et al., 2011).

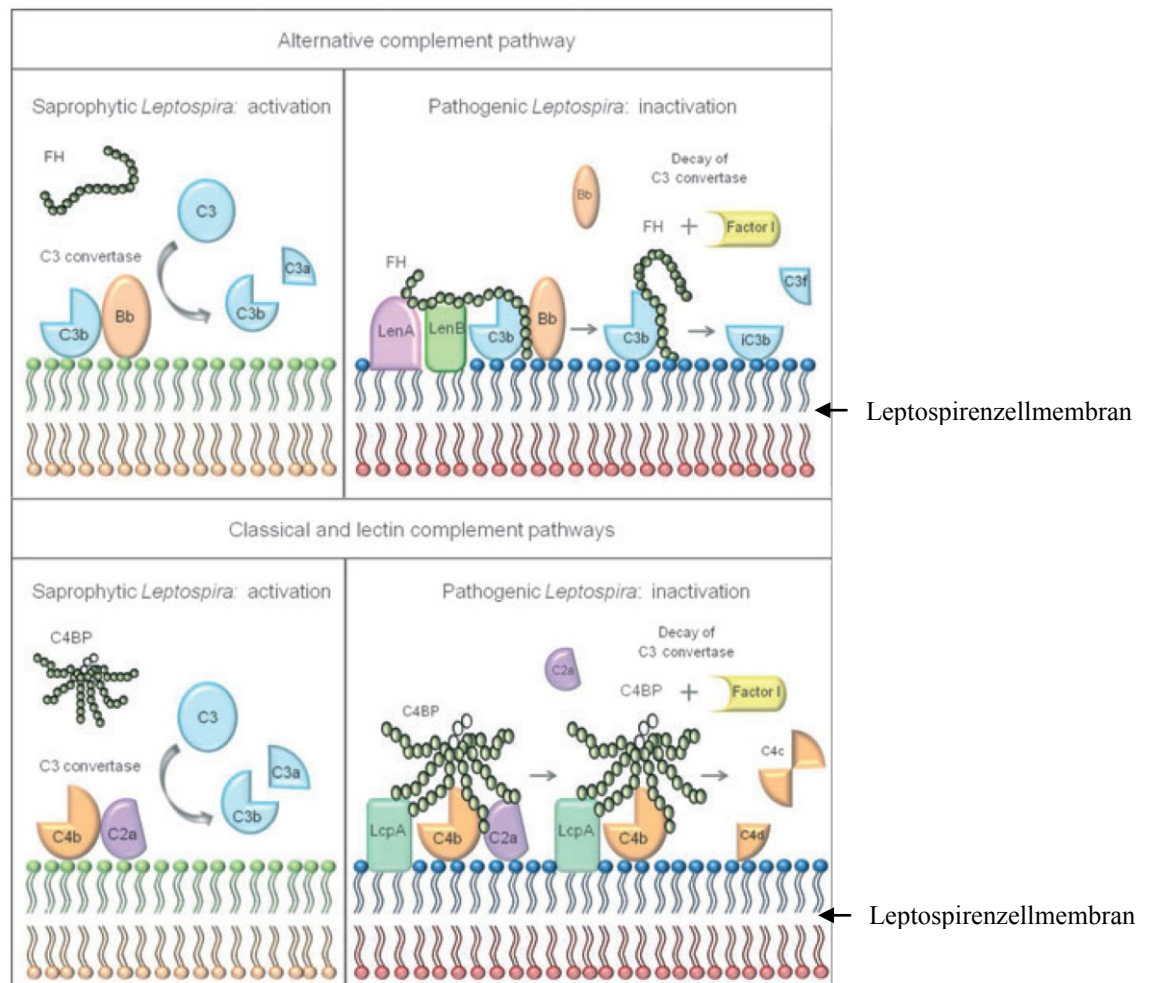


Abbildung 4: Mechanismen der Immunevasion pathogener Leptospiren vor dem Komplementsystem

Nach Fraga et al. (FRAGA et al., 2011)

LcpA: Membranprotein der äußeren Zellmembran pathogener Leptospiren, interagiert mit humanen C4BP; **Faktor I:** Inhibitor der Komplementkaskade; **C3 a-c, C4 b und d, Bb:** Aktivierungsfaktoren in der Komplementkaskade

Saprophytäre Leptospiren werden durch das Komplementsystem inaktiviert da sie, im Gegensatz zu pathogenen Leptospiren, nicht die Fähigkeit besitzen Faktor H (**FH**) und C4 Binding Protein (**C4BP**) zu binden. Die Len Proteine pathogener Leptospiren binden humanen Faktor H und unterbrechen so den alternativen Weg der Komplementaktivierungskaskade. Der klassische Weg kann durch die Bindung des Regulators C4BP unterbrochen werden.

4 Epidemiologie

4.1 Epidemiologie des Menschen

Im Jahr 1886 beschrieb Adolf Weil erstmals das Auftreten einer akuten Infektionskrankheit beim Menschen, die mit einer Splenomegalie, Ikterus und akuter Niereninsuffizienz assoziiert

war. Weil beobachtete, dass vor allem Metzger von der Infektionskrankheit betroffen waren und die Infektion nur in regional begrenzten Gebieten auftrat (WEIL, 1886). Der Begriff der Weil'schen Krankheit wird bis heute verwendet (TOYOKAWA et al., 2011). Im Jahr 1915 konnte, unabhängig voneinander, in Japan und in Deutschland der Erreger der Infektionskrankheit nachgewiesen werden (LEVETT, 2001). Inada et al. beschrieben erstmals *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* als infektiöses Agens der Erkrankung (INADA et al., 1916). Bereits zwei Jahre später konnte die Ratte als Überträger von *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* identifiziert werden (IDO et al., 1917). Weitere Synonyme für die humane Leptospirose haben sich aufgrund der verschiedenen Expositionsquellen und Transmissionswege von *Leptospira spp.* geprägt. Dazu zählen unter anderem die Synonyme Schweinehüterkrankheit, Reisfeldfieber oder Schlammfieber (WHO, 2003). Noch immer gilt die Leptospirose des Menschen als eine wichtige Zoonose in Entwicklungsländern, die dort vor allem in ländlichen Gegenden eine Rolle spielt. Durch die Globalisierung werden jedoch auch vermehrt Ausbrüche in Industrieländern dokumentiert. Dabei gelten Militäreinsätze sowie zunehmende Reiseaktivitäten in endemische Regionen als wichtige Verbreitungswege der Infektionskrankheit (PAPPAS et al., 2008). In Deutschland, Japan oder den USA gewinnt die Leptospirose immer mehr an Bedeutung (JANSEN et al., 2005; KOIZUMI et al., 2009; REIS et al., 2008; VINETZ et al., 1996). Trotz der globalen Verbreitung gibt es keine gesicherten epidemiologischen Daten über die weltweite Prävalenz. Meist fehlen in endemischen Regionen einheitliche Meldesysteme, oder die Erkrankung wird falsch beziehungsweise gar nicht diagnostiziert (HARTSKEERL et al., 2011; SOCOLOVSKI et al., 2011). Die angenommene Anzahl der weltweit jährlich auftretenden humanen Infektionen liegt bei einer halben Millionen Fälle (HARTSKEERL et al., 2011; WHO, 2003). Man geht jedoch von einer weit höheren Anzahl an Infektionen aus, da vor allem gesicherte epidemiologische Daten für Afrika, Länder der östlichen mediterranen Gegenden und Europa fehlen (WHO, 2011). Die Letalitätsrate bei den erfassten Leptospirose-Fällen variiert dabei zwischen 3 % und 50 % (HARTSKEERL et al., 2011). In Deutschland gemeldete Fälle der Jahre 1962 bis 2003 zeigten einen stetigen Rückgang bis 1997, gefolgt von einem kontinuierlichen Anstieg bis 2003. Infektionen traten sowohl in ländlichen als auch vermehrt in städtischen Regionen auf. Bestimmte Berufsgruppen, vermehrte Reiseaktivitäten, die Ausübung von Wassersportarten (31 % der gemeldeten Fälle), Gartenarbeiten sowie der Kontakt zu Haustieren (37 % der gemeldeten Fälle) wurden als Expositionsquellen angegeben. Bei den Haustieren gelten vor allem Hunde als Infektionsquelle. Gehäuft traten Fälle im Osten Deutschlands in Gegenden mit großen Süßwasserflächen auf (Abbildung 5). Innerhalb Europas besteht die höchste Expositionsgefahr

bei Reisen nach Frankreich, welches als das Land mit der höchsten Leptospirose-Inzidenz im westlichen Europa gilt (JANSEN et al., 2005). Der letzte bestätigte große Leptospiroseausbruch in Deutschland stammt aus dem Jahr 2007. In Nordrhein-Westfalen infizierten sich dreizehn Feldarbeiter mit dem Serovar Grippotyphosa während der Arbeit auf einem Erdbeerfeld (DESAI et al., 2009; ROBERT KOCH INSTITUT, 2008). In Österreich erkrankten im Jahr 2010 vier Triathleten an Leptospirose, nachdem sie einen See durchschwommen hatten, in den durch schwere Regenfälle kontaminierter, tierischer Urin eingeschwemmt wurde (RADL et al., 2011). Das vermehrte Auftreten humaner Leptospirosefälle innerhalb Deutschlands ist auf die zunehmende Exposition zu neuen Infektionsquellen zurückzuführen und ist nicht mehr vorrangig auf ländliche Regionen begrenzt (JANSEN et al., 2005).



Abbildung 5: Regionale Verbreitung der humanen Leptospirose in Deutschland

Nach Jansen et al. (JANSEN et al., 2005)

Die Abbildung basiert auf den gemeldeten Leptospirosefällen der Jahre 1997 bis 2003. Die Inzidenz bezieht sich auf die Anzahl der gemeldeten Fälle pro 100.000 Einwohner. Das höchste Vorkommen liegt in Mecklenburg-Vorpommern und Brandenburg.

4.2 Epidemiologie der Haussäugetiere

Bereits im Jahr 1899 wurde das Auftreten der kaninen Leptospirose erstmals durch Klett beschrieben. Die Erkrankung wurde lange Zeit als „Typhus des Hundes“ oder synonym als Stuttgarter Hundeseuche bezeichnet (MCINTYRE et al., 1952). 1933 gelang bei Hunden in Holland erstmalig die Beschreibung eines anderen Leptospirenstammes, der sich von dem bisher bekannten Stamm *Icterohaemorrhagiae* der Weil'schen Krankheit serologisch unterschied. Klarenbeek und Schüffner nahmen an, dass dieser Stamm auf den Menschen übertragbar ist und klinische Erkrankungen verursachen kann (KLARENBEEK et al., 1933). Bis 1960 wurden bei klinischen Erkrankungen des Hundes nur die Serovare *Icterohaemorrhagiae* und *Canicola* als Erreger der Leptospirose angesehen (Tabelle 2) (GOLDSTEIN, 2010). Diese zwei genannten Serovare wurden über 30 Jahre in einem bivalenten Impfstoff eingesetzt (ELLIS, 2010; SYKES et al., 2011). Die lange Verwendung dieses Impfstoffes und die Einbeziehung neuer Serogruppen bei serologischen Studien veränderten das epidemiologische Bild. Seitdem sind zahlreiche Serovare bei Hunden beschrieben worden (Tabelle 2) (GREENE, 2012), wobei vor allem verschiedene Leptospirenserovare der Genospezies *L. interrogans* und *L. kirschneri* als Hauptverursacher der kaninen Leptospirose gelten (SYKES et al., 2011). Im Iran und in Brasilien wurden die Genospezies *Leptospira wolffii* und *Leptospira noguchii* bei erkrankten Hunden isoliert (SILVA et al., 2009; ZAKERI et al., 2010). Inwieweit sie jedoch eine Rolle in der Pathogenese spielen ist noch nicht bekannt (SYKES et al., 2011). Innerhalb Europas ist die epidemiologische Situation nicht einheitlich (ELLIS, 2010). Bei klinisch erkrankten Hunden aus dem süddeutschen Raum wurden verschiedene Serovare als infektiöses Agens nachgewiesen (Tabelle 2) (GEISEN et al., 2007). Auch in den USA und Kanada galten lange Zeit nur die Serovare *Icterohaemorrhagiae* und *Canicola* als Erreger der kaninen Leptospirose (BIRNBAUM et al., 1998; BOLIN, 1996). Das Auftreten neuer Serovare wird mit einer vermehrten Exposition zu neuen, atypischen Reservoirwirten assoziiert (GREENE, 2012). Dazu zählen Wildtiere wie der Waschbär, Stinktiere und Opossums, die als Reservoir für die Serovare *Pomona* und *Icterohaemorrhagiae* ermittelt wurden (BOLIN, 1996). Viele dieser serologischen Studien basieren jedoch auf dem MAT, der keine gesicherte Aussage über das infizierende Serovar zulässt (GOLDSTEIN, 2010).

Katzen sind nach bisherigen Erkenntnissen dagegen für eine Infektion mit *Leptospira* spp. wenig empfänglich. Das Auftreten klinischer Symptome ist selten beschrieben und experimentelle Infektionen führen nur zu milden klinischen Veränderungen (ANDRE-

FONTAINE, 2006; SYKES et al., 2011). Die Prävalenz von AK gegen Leptospiren bei Katzen liegt bei unter 10 % (AGUNLOYE et al., 1996; GREENE, 2012). In Schottland und Deutschland wurden die Seroprävalenzen von 10 % und 20 % ermittelt. Lediglich in Frankreich korrelierte der Nachweis von AK mit klinischen Symptomen (Tabelle 2) (GREENE, 2012).

Rinder gelten weltweit als Reservoirwirte für *L. interrogans* Serovar Hardjo Stamm Hardjoprajitno und *L. borgpetersenii* Serovar Hardjo Stamm Hardjo-Bovis (Tabelle 2). Beide Stämme sind serologisch nicht voneinander zu unterscheiden (LEFEBVRE et al., 1987; RYAN et al., 2012; VAN DE WEYER et al., 2011). Der Stamm Hardjo-Bovis ist besser an das Rind adaptiert und kann weltweit nachgewiesen werden (SCHMID, 2005). Dieser Stamm wird als Hauptursache für klinische Erkrankungen angesehen (CORTESE et al., 2007; GIVENS, 2006; RINEHART et al., 2012). Der Stamm Hardjoprajitno persistiert vor allem im Genitaltrakt (GIVENS, 2006). Er kommt primär in Europa vor und ist in Großbritannien meist ursächlich beim Auftreten von Infertilität beim Rind (GIVENS, 2006; SCHMID, 2005). Neben chronischen Trägerstadien mit dem adaptierten Serovar Hardjo werden sporadisch auch andere Serovare beim Rind nachgewiesen (Tabelle 2). Eine Infektion mit diesen Serovaren führt zu akuten Erkrankungen und Aborten (VAN DE WEYER et al., 2011). Bei Jungrindern in Bayern wurde am häufigsten das Serovar Hardjo detektiert (55 %). Die Serovare Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Bratislava und Canicola wurden, neben zahlreichen anderen Serovaren, mit 18 %, 13 %, 8 % und 5 % ermittelt (SCHMID, 2005).

Für kleine Wiederkäuer liegen kaum gesicherte epidemiologische Daten vor (LILENBAUM et al., 2008; MARTINS et al., 2011). Ziegen und Schafe gelten als Träger des Stammes Hardjo-Bovis (Tabelle 2). In Brasilien wurden die Serogruppen Sejroe und Shermani nachgewiesen (LILENBAUM et al., 2009). Bei Schafen aus Brasilien wurde erstmals auch *Leptospira noguchii* detektiert. Im Allgemeinen variiert das Auftreten verschiedener Serovare beim Schaf jedoch weltweit (SILVA et al., 2007).

Schweine gelten als Reservoirwirte für die Serovare Pomona, Bratislava und Tarassovi (Tabelle 2) (HEINRITZI et al., 2006; STRUTZBERG-MINDER et al., 2011). Am besten ist das Serovar Tarassovi an das Schwein adaptiert (HEINRITZI et al., 2006). Das Serovar Bratislava kann neben der Niere auch im oberen Genitaltrakt von Sauen und im Sperma von Ebern persistieren. Daher spielt auch die sexuelle Übertragung eine Rolle im Infektionszyklus des Schweins. Wie bei allen Säugetieren zeigt das Auftreten bestimmter Serovare regionale Unterschiede. Vor allem in Gegenden, in denen endemische Naturherdinfektionen in

Nagerpopulationen vorliegen, variiert das Auftreten der Serovare. Die letzte in Deutschland durchgeführte epidemiologische Studie stammt aus dem Jahr 1984. Die am häufigsten nachgewiesenen Serovare waren dabei Saxkoebing und Grippytyphosa (STRUTZBERG-MINDER et al., 2011).

Pferde infizieren sich sporadisch mit *Leptospira* spp. Dabei spielen die Serovare Kennewicki und Grippytyphosa eine Rolle (Tabelle 2) (DIETZ et al., 2006; WHITWELL et al., 2009). Viele Tiere weisen AK gegen verschiedene Leptospirenservare auf, ohne klinisch zu erkranken (WHITWELL et al., 2009). Als Kontaminationsquellen für Pferde werden vor allem mit Nagerurin verunreinigtes Futter oder Weiden angesehen. Auch der direkte Kontakt zu anderen Pferden, die Leptospiren mit dem Urin ausscheiden, ist eine mögliche Infektionsquelle (BAVERUD et al., 2009). Neben sporadisch auftretenden, systemischen Infektionen und Aborten kommt es auch zu Manifestationen am Auge (DIETZ et al., 2006). Verschiedene Serovare von *L. interrogans*, *L. kirschneri* und *L. borgpetersenii* sind bei an der equinen rekurrenten Uveitis (ERU) erkrankten Pferden nachgewiesen worden (Tabelle 2). Der Nachweis basiert auf der Detektion von AK in der Glaskörperflüssigkeit erkrankter Tiere mittels MAT (CURLING, 2011). In Amerika dominiert *L. interrogans* Serovar Pomona, in Europa *L. kirschneri* Serovar Grippytyphosa (CURLING, 2011; VERMA et al., 2005). In Deutschland wurden neben dem häufigsten Serovar Grippytyphosa auch AK gegen die Serovare Pomona, Bratislava, Copenhageni und Javanica beim Pferd ermittelt (BRANDES et al., 2007).

Tabelle 2: Häufig detektierte Serovare bei den Haussäugetieren

| Tierart | Genospezies | Serogruppe | Serovar | Referenz |
|---------|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Hund | <i>L. interrogans</i> | ^b icterohaemorrhagiae | ^{a, c} Icterohaemorrhagiae | ^c (GEISEN et al., 2007) ^b (ELLIS, 2010) ^a (SYKES et al., 2011) ^a (GREENE, 2012) |
| | <i>L. interrogans</i> | ^b canicola | ^{a, c} Canicola | |
| | <i>L. interrogans</i> | pomona | ^a Pomona | |
| | <i>L. interrogans</i> | ^b australis | ^{a, c} Bratislava | |
| | <i>L. interrogans</i> | ^b sejroe | ^c Saxkoebing | |
| | <i>L. kirschneri</i> | ^b grippotyphosa | ^{a, c} Grippotyphosa | |
| Katze | nicht angegeben | ^d autumnalis | nicht angegeben | (GREENE, 2012) |
| | nicht angegeben | ^d bratislava | nicht angegeben | |
| | nicht angegeben | ^{d, e} canicola | nicht angegeben | |
| | nicht angegeben | ^d grippotyphosa | nicht angegeben | |
| | nicht angegeben | ^d hardjo | nicht angegeben | |
| | nicht angegeben | ^{d, e} icterohaemorrhagiae | nicht angegeben | |
| | nicht angegeben | ^d pomona | nicht angegeben | |
| | nicht angegeben | ^e sejroe | nicht angegeben | |
| Rind | <i>L. borgpetersenii</i> | nicht definiert | ^R Hardjo | (GIVENS, 2006) (CORTESE et al., 2007) (VAN DE WEYER et al., 2011) (RINEHART et al., 2012) |
| | <i>L. interrogans</i> | sejroe | ^R Hardjo | |
| | <i>L. interrogans</i> | icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | |
| | <i>L. interrogans</i> | pomona | Pomona | |
| | <i>L. kirschneri</i> | nicht angegeben | Grippotyphosa | |

Tabelle 2: Fortsetzung

| Tierart | Genospezies | Serogruppe | Serovar | Referenz |
|--------------------|--|--|---|--|
| kleine Wiederkäuer | nicht angegeben nicht angegeben <i>L. noguchii</i> | sejroe shermani autumnalis | Hardjo nicht angegeben nicht angegeben | { (LILENBAUM et al., 2009) (SILVA et al., 2007) |
| Schwein | <i>L. interrogans</i> <i>L. interrogans</i> <i>L. interrogans</i> | pomona australis australis tarassovi | ^R Pomona Australis ^R Bratislava ^R Tarassovi | { (HEINRITZI et al., 2006) (STRUTZBERG-MINDER et al., 2011) |
| Pferd | <i>L. interrogans</i> <i>L. interrogans</i> <i>L. interrogans</i> <i>L. interrogans</i> <i>L. interrogans</i> <i>L. interrogans</i> <i>L. kirschneri</i> <i>L. borgpetersenii</i> <i>L. borgpetersenii</i> | australis nicht definiert canicola icterohaemorrhagiae pomona pomona grippotyphosa sejroe ballum | Australis Bratislava Canicola Icterohaemorrhagiae Pomona Kennewicki Grippotyphosa Sejroe Ballum | { (DIETZ et al., 2006) (WHITWELL et al., 2009) (CURLING, 2011) |

^R Reservoirwirt^a häufig auftretende Serovare bei Hunden in den USA^b dominierende Serogruppen innerhalb Europas^c in Süddeutschland nachgewiesene Serovare bei klinisch erkrankten Hunden^d bei klinisch gesunden Katzen nachgewiesene Serogruppen in den USA^e in Frankreich detektierte Serovare die mit klinischen Symptomen bei Katzen korrelierten**Zur Vereinfachung ist nur die Genospezies dargestellt die mit dem isolierten Serovar assoziiert wird.**

5 Leptospirose

5.1 Leptospirose des Menschen

Der Mensch fungiert als Zufallswirt und erkrankt bei einer Infektion mit pathogenen Leptospiren meist akut. Nach einer Infektion können *Leptospira* spp. innerhalb weniger Minuten p.i. im Blut des Patienten nachgewiesen werden (KO et al., 2009). Ab dem dritten Tag p.i. ist der Erreger in verschiedenen Organen detektierbar (FAINE, 1957; LOURDAULT et al., 2009). Der klinische Verlauf einer Leptospirose ist typischerweise durch zwei Phasen geprägt (Abbildung 6) (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001). Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen bis zwei Wochen kommt es in der akuten oder septikämischen Phase zu milden, fieberhaften Symptomen, die häufig selbstlimitierend sind (KO et al., 2009; LEVETT, 2001). Diese Phase ist durch die Produktion von AK und späterer Ausscheidung des Erregers mit dem Urin gekennzeichnet (LEVETT, 2001). Der Anstieg der Körpertemperatur korreliert dabei mit dem Auftreten von AK im Serum. Der milde klinische Verlauf in der frühen Phase der Infektion wird auf das geringe endotoxische Potenzial des LPS von Leptospiren zurückgeführt (KO et al., 2009). Mit zunehmendem Anstieg der Antikörperkonzentration ist der Erreger nicht mehr im Blut nachweisbar (KO et al., 2009; LEVETT, 2001). Wird der Erreger nicht eliminiert, kann er anschließend in verschiedene Organe eindringen. Das Ausmaß der Gewebeschädigung hängt von der Virulenz des infizierenden Serovars, der Bakterienmenge, sowie von der Effektivität der Bildung spezifischer AK ab. In der Niere kann der Organismus jedoch trotz AK-Bildung häufig weiter persistieren und vermehrt sich in den renalen Tubulusepithelzellen (GOLDSTEIN, 2010). In endemischen Gebieten zeigen die meisten Patienten nach einer Infektion keine klinischen Veränderungen (PAPPAS et al., 2006). Schwere klinische Verlaufsformen werden bei 5 % bis 15 % der Patienten beschrieben (KO et al., 2009). Dabei steht vor allem die Schädigung des Endothels der Blutgefäße im Vordergrund (DE et al., 1979; NICODEMO et al., 1997), wodurch es zu Hämorrhagien und Gewebeschädigungen kommt (KO et al., 2009). Schädigungen in den Organen kommen auch durch die immunmedierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zustande (KO et al., 2009). Bei 50 % bis 80 % der tödlichen Krankheitsverläufe tritt eine Thrombozytopenie auf. Leptospiren besitzen die Fähigkeit, die Gerinnungskaskade zu aktivieren und lösen so einen disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) aus (CHIERAKUL et al., 2008). Die schwerwiegendste Form der humanen Leptospirose ist der sogenannte Morbus Weil. Typisch sind unspezifische Symptome, assoziiert mit einem Ikterus und einer Splenomegalie. Eine akute Niereninsuffizienz, Thrombozytopenie und zusätzlich schwere Hämorrhagien können auftreten.

(TOYOKAWA et al., 2011). Eine besonders schwere Form ist das sogenannte hämorrhagische pulmonale Syndrom (LPHS, leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome) (KO et al., 2009). Diese Form der Leptospirose wurde erstmals in China und Korea beschrieben (PARK et al., 1989). 1995 starben 15 Personen bei einem großen Ausbruch in Nicaragua an LPHS (TREVEJO et al., 1998). Das Syndrom ist durch schwere Blutungen in der Lunge und dem damit verbundenen Untergang des Lungengewebes gekennzeichnet. Im Lungengewebe der Patienten können große Mengen an Leptospiren-DNA nachgewiesen werden. Die genaue Pathogenese ist derzeit noch nicht bekannt (KO et al., 2009). Ohne rechtzeitigen Beginn der Therapie kann das LPHS innerhalb von 72 Stunden zum Tod führen. Die Mortalitätsrate für Morbus Weil liegt zwischen 5 % bis 15 %, bei LPHS beträgt sie sogar 30 % bis 70 % (TOYOKAWA et al., 2011). Soweit ein Hinweis auf eine akute Infektion gegeben ist, ist der Nachweis von Leptospiren beim Menschen in Deutschland nach dem § 7 des Infektionsschutzgesetzes meldepflichtig (IFSG, 2011).

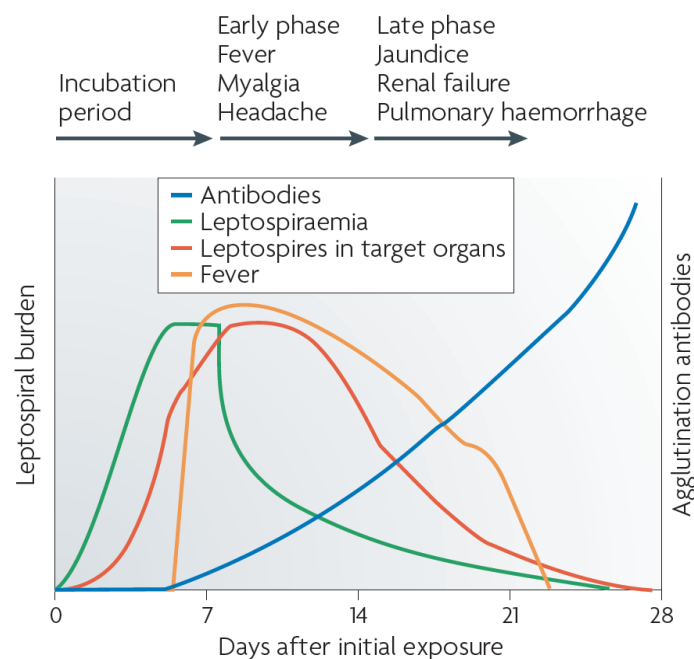


Abbildung 6: Schematische Darstellung des zweiphasigen Verlaufs (early and late Phase) der humanen Leptospirose

Nach Ko et al. (KO et al., 2009)

Die frühe Phase der Infektion ist durch unspezifische, Grippe-ähnliche Symptome gekennzeichnet. Schwere klinische Veränderungen in der späten Phase der Erkrankung sind auf Schädigungen des Gefäßendothels, sowie dem immunmedierten Gewebeuntergang in den Organen zurückzuführen.

5.2 Leptospirose der Haussäugetiere

Die Leptospirose des Hundes wurde erstmals im Jahr 1899 beschrieben. Bis 1960 galten akutes oder subakutes Nieren- und Leberversagen als typisches Krankheitsbild bei einer Infektion mit Leptospiren. Heutzutage ist eine große Bandbreite klinischer Veränderungen beschrieben (GOLDSTEIN, 2010). Neben milden Symptomen können je nach Immunstatus des Wirtes, der geographischen Lage und dem infizierenden Serovar auch schwere Erkrankungen mit letalem Ausgang auftreten (SYKES et al., 2011). Junge Hunde erkranken häufig schwer. Bei erwachsenen Hunden sind meist große Rassen sowie im Freien gehaltene Tiere betroffen. Bei perakuten Verläufen kommt es zu einer massiven Leptospiämie. Akute und subakute Verlaufsformen können mit verschiedenen, unspezifischen Symptomen einhergehen (GREENE, 2012). Häufig beobachtete Symptome sind neben Nieren- und Leberversagen pulmonale Hämorrhagien, petechiale Blutungen, Uveitis, Aborte und akute fieberhafte Erkrankungen. Die mit dem Nierenversagen einhergehenden klinischen Veränderungen können unter anderem Polyurie, Polydipsie, Anurie, Oligurie, Erbrechen und Dehydratation verursachen. Ist die Leber betroffen kann ein Ikterus entstehen. Wie bei der humanen Leptospirose wird auch bei Hunden vermehrt das Auftreten des LPHS in einigen Teilen Europas beobachtet (GREENE, 2012; SYKES et al., 2011). Dies kann sich klinisch durch Tachypnoe und Dyspnoe äußern. Häufige Veränderungen der Laborparameter umfassen Thrombozytopenie (in 58 % der Fälle), mehr als 80 % bis 90 % der Hunde zeigen einen Anstieg von Harnstoff und Kreatinin im Serum und eine Erhöhung der Leberenzymaktivitäten (ALP, ALT, AST) in Kombination mit einer Bilirubinämie. Des Weiteren treten Veränderungen im Elektrolythaushalt auf. Die Analyse des Urins kann eine Glukosurie, Proteinurie, Bilirubinurie, Hämaturie oder Pyurie zeigen, sowie vermehrt Zylinder im Sediment aufweisen. Als hinweisend für eine Infektion mit Leptospiren wird vor allem das kombinierte Auftreten einer Azotämie mit erhöhten Leberenzymwerten angesehen (SYKES et al., 2011).

Bei chronischen Infektionen der Rinder stehen Reproduktionsstörungen und Mastitiden im Vordergrund. *Leptospira* Hardjo verursacht Aborte, Frühgeburten, Totgeburten, untypische Mastitiden und Agalaktie (ELLIS et al., 1986; KINGSCOTE, 1985; LEFEBVRE et al., 1987). Die beiden wirtsadaptierten Genotypen, Hardjo-Bovis und Hardjoprajitno, verursachen zusammen Abortraten zwischen 3 % bis 10 %. Der Genotyp Hardjoprajitno verursacht zusätzlich klinische Mastitiden und führt zu einem Rückgang der Milchleistung (GIVENS, 2006). Eine Infektion mit dem Stamm Hardjo-Bovis verläuft häufig klinisch inapparent, führt jedoch zum Ausscheiden des Erregers im Urin (CORTESE et al., 2007). Schwere klinische

Veränderungen entwickeln vor allem jüngere Tiere. Die Letalitätssrate bei Kälbern liegt zwischen 5 % bis 15 %. Bei älteren Tieren ist sie mit 2 % bis 4 % beschrieben (DIRKSEN et al., 2002). Da der Erreger intensiv mit dem Urin, Fruchtwasser, Nachgeburten, Sperma und beim Auftreten einer Mastitis auch mit der Milch ausgeschieden wird (GIVENS, 2006), stellen chronisch infizierte Rinder auch eine Infektionsquelle für den Menschen dar (GIVENS, 2006; SCHMID, 2005).

Chronische Infektionen können bei kleinen Wiederkäuern zu Reproduktionsstörungen führen, die große wirtschaftliche Verluste verursachen. Akute Infektionen können mit Fieber, Anorexie, Ikterus und Hämorrhagien einhergehen (LILENBAUM et al., 2008; LILENBAUM et al., 2009; MARTINS et al., 2011). Im Allgemeinen gelten Schafe und Ziegen als weniger empfänglich für eine Infektion mit Leptospiren als Rinder (LILENBAUM et al., 2008). Die Leptospirose des Schafes unterliegt in Deutschland nach Anhang 1 der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten der Meldepflicht (STRUTZBERG-MINDER et al., 2011; TKRMELDEPFLV, 2011).

Eine chronisch infizierte Schweineherde zeigt meist keine oder nur milde klinische Veränderungen. Werden Leptospiren in eine naive Schweineherde eingetragen kommt es zu Reproduktionsstörungen und Aborten. Klinisch erkranken vor allem Ferkel und tragende Sauen (STRUTZBERG-MINDER et al., 2011). Der Erreger repliziert sich neben der Niere auch in der Plazenta. Ab dem zweiten Trächtigkeitsmonat kann der Erreger auf die Feten übergehen. Charakteristisch ist das Auftreten von Aborten in der zweiten Hälfte Trächtigkeit, wobei die Feten typischerweise in verschiedenen Entwicklungsstadien abortiert werden. Es kommt zur Geburt lebensschwacher oder mumifizierter Feten. Eine Infektion mit Leptospiren in Mastschweinbeständen verläuft hingegen klinisch meist inapparent und stellt daher ein Zoonoserisiko für den Menschen dar. Infektionen mit nicht wirtsadaptierten Serovaren können zu klinischen Veränderungen führen. Bei Sauen und Ebern sind die Serovare Muenchen und Bratislava beschrieben (HEINRITZI et al., 2006). Eine Infektion von Schweinen mit dem Serovar Bratislava ist schwer zu diagnostizieren, da dieses Serovar nur einen geringen Anstieg von AK verursacht (BOLIN et al., 1991; HEINRITZI et al., 2006). Die Leptospirose des Schweins unterliegt in Deutschland nach Anhang 1 der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten der Meldepflicht (STRUTZBERG-MINDER et al., 2011; TKRMELDEPFLV, 2011).

Fieber, Hämoglobinurie, Ikterus und Manifestationen am Auge stehen bei klinischen Symptomen der Pferde im Vordergrund. Aborte im zweiten Drittel der Trächtigkeit können auftreten, sind aber seltener beschrieben als bei anderen Nutztieren (DIETZ et al., 2006;

HAMOND et al., 2012; SZEREDI et al., 2006). Aborte werden vor allem durch *L. interrogans* Serovare Pomona Stamm Kennewicki verursacht (DIETZ et al., 2006; SZEREDI et al., 2006; TIMONEY et al., 2011). Die equine recurrente Uveitis (ERU) ist durch das periodische Auftreten klinisch symptomloser Phasen gekennzeichnet. Die Ätiologie dieser Erkrankung ist jedoch noch nicht sicher belegt (BRANDES et al., 2007; CURLING, 2011; VERMA et al., 2005). Neben verschiedenen Viren und Bakterien werden vor allem pathogene Leptospiren als auslösender Faktor betrachtet (CURLING, 2011). Der Nachweis von AK mittels MAT gegen Leptospiren aus der Glaskörperflüssigkeit macht eine Beteiligung von *Leptospira* spp. an der Entstehung der Uveitis sehr wahrscheinlich (CURLING, 2011). Zusätzlich können aus über 50 % der betroffenen Glaskörper vitale Leptospiren angezüchtet werden (DIETZ et al., 2006). Das Sistieren pathogener Leptospiren löst eine zellvermittelte Immunantwort aus, die primär T-Zell-vermittelt ist und zu entzündlichen Veränderungen des Auges führt. In geringerer Anzahl spielen B-Zellen eine Rolle. Mit jeder neu auftretenden Periode werden die klinischen Symptome schwerwiegender (CURLING, 2011). Eine Uveitis entwickelt sich meist Monate bis Jahre nach der initialen Infektion mit Leptospiren (CURLING, 2011; DIETZ et al., 2006). Das Endstadium ist durch eine chronische Uveitis gekennzeichnet und kann bei der Hälfte der Pferde zum Verlust der Sehfähigkeit führen (CURLING, 2011).

6 Therapie und Prophylaxe

6.1 Therapie des Menschen

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO, World Health Organization) empfiehlt eine antibiotische Therapie sobald der Verdacht auf eine Infektion mit Leptospiren gegeben ist. Für eine erfolgreiche Behandlung sollte die Therapie innerhalb der ersten vier Tage nach dem Einsetzen der klinischen Symptome begonnen werden. Der Erfolg einer Behandlung hängt dabei von der frühzeitigen und sachgerechten Applikation ab. Die Gabe von Antibiotika in der späten Phase der Erkrankung oder beim Vorliegen schwerer klinischer Symptome wird kontrovers diskutiert (WHO, 2003). Doxycyclin verhindert innerhalb der ersten vier bis fünf Tage nach dem Auftreten klinischer Symptome schwere Verlaufsformen und verkürzt die Krankheitsdauer. Beta-Lactam-Antibiotika zeigen eine gute Wirksamkeit bei milden klinischen Symptomen. Penicillin ist das am häufigsten verwendete Antibiotikum, das in der späten Phase einer Infektion eingesetzt wird (FAUCHER et al., 2004; PAPPAS et al., 2006). Auch Cephalosporine der dritten Generation zeigen eine gute Wirksamkeit und können anstatt

Penicillinen verwendet werden (PAPPAS et al., 2006). Eine mögliche Komplikation, die bei der antibiotischen Behandlung spirochätaler Infektionen auftreten kann, ist die sogenannte Jarisch-Herxheimer-Reaktion die für verschiedene Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine und Tetrazykline beschrieben ist. Im Vergleich zu anderen durch Spirochäten verursachten Infektionen tritt sie bei der Leptospirose jedoch seltener auf (FAUCHER et al., 2004). Die Jarisch-Herxheimer-Reaktion beruht auf der plötzlichen, durch die Therapie bedingte, massive Freisetzung von AG, die zur Produktion von Zytokinen führt. Durch die so entstehende schwere Entzündungsreaktion kann es zur Schädigung der Organe kommen und der Patient zeigt plötzlich hohes Fieber (KO et al., 2009). Flüssigkeitssubstitution sowie der Ausgleich der Elektrolyte ist ebenso wichtig wie die antibiotische Versorgung der Patienten. Eine Intubation und künstliche Beatmung sollte bei Patienten mit schwerem LPHS durchgeführt werden (GUERRA, 2009). Die Gabe von Cyclophosphamid und Plasmaersatz wirken sich positiv bei schwerem LPHS aus (SYKES et al., 2011).

6.2 Therapie der Haussäugetiere

Bei Hunden sollte mit der antibiotischen Therapie begonnen werden sobald der klinische Verdacht auf eine Infektion mit Leptospiren gegeben ist. Penicilline und deren Derivate gelten als Mittel der Wahl für die Beendigung der Leptospirämie (GOLDSTEIN, 2010; GREENE, 2012). Dadurch kann die Leptospirurie innerhalb 24 Stunden nach Beginn der Therapie beendet und das Infektionsrisiko für andere Tiere und den Menschen gesenkt werden (GOLDSTEIN, 2010). Tiere, die schwere klinische Veränderungen wie Erbrechen aufweisen, erhalten initial Ampicillin oder Amoxicillin i.v. (Tabelle 3). Um den Erreger aus der Niere zu eliminieren sollte anschließend, in der zweiten Phase der Therapie, Doxycyclin oral verabreicht werden. Auch die alleinige Gabe von Doxyxclin für die Therapie ist beschrieben (Tabelle 3). Wie lange die antibiotische Therapie andauern soll ist noch nicht abschließend geklärt, sollte aber mindestens zwei (SYKES et al., 2011) bzw. drei Wochen (GREENE, 2012) betragen. Eine massive Infusionstherapie ist bei dehydrierten Tieren und bei vorliegenden Nierenschäden zu empfehlen. Hunde mit LPHS sollten, je nach Schwere der Symptome, Sauerstoff erhalten oder mechanisch beatmet werden. Die Überlebensrate von adäquat behandelten Patienten liegt bei 80 %. Die Prognose für Tiere mit schweren respiratorischen Veränderungen ist dagegen vorsichtig zu stellen. Die Mortalitätsrate lag in zwei Studien bei 36 % und 48 % (SYKES et al., 2011).

Tabelle 3: Antibiotisches Behandlungsschema für die kanine Leptospirose

| Antibiotikum | Dosierung | Applikation | Quelle |
|---------------------------|--|-------------|---|
| ^a Doxycyclin | 5 mg/kg alle 12 Stunden für mindestens 14 Tage | PO oder IV | { (GOLDSTEIN, 2010); (SYKES et al., 2011); (GREENE, 2012) |
| ^b Ampicillin | 22 mg/kg alle 12 Stunden | IV | { (GOLDSTEIN, 2010); (GREENE, 2012) |
| ^b Amoxicillin | 22 mg/kg alle 12 Stunden | IV | |
| ^b Ampicillin | 22 mg/kg alle 6 bis 8 Stunden | IV, SC | { (SYKES et al., 2011); (GREENE, 2012) |
| ^b Penicillin G | 25 bis 40 u/kg alle 12 Stunden | IV, SC, IM | |

^a Dosierung und Dauer bei alleiniger Doxycyclin Therapie

^b Dosierung bei anfänglicher, parenteraler Gabe eines anderen Antibiotikums. ^a Doxycyclin wird anschließend verwendet.

IV = intravenös; IM = intramuskulär; PO = per os; SC = subkutan; u = units

Die Eindämmung der bovinen Leptospirose beruht vor allem auf dem präventiven Einsatz kommerziell erhältlicher Impfstoffe (siehe Abschnitt 6.3) (CORTESE et al., 2007; VAN DE WEYER et al., 2011). Die Immunisierung verhindert jedoch nicht die Ausscheidung des Stammes Hardjo-Bovis mit dem Urin. Durch die zusätzliche Gabe von Antibiotika wie Oxytetracyclin (20 mg/kg intramuskulär), sowie der Injektion von Ceftiofur wird das renale Trägerstadium beendet. Bei Bullen ist die Elimination des Erregers mittels Antibiotika schwieriger, da Leptospiren neben der Niere auch in der Samenblase persistieren (GIVENS, 2006). Cortese et al. konnten zeigen, dass Tulathromycin und Ceftiofur bei nicht geimpften Rindern den Erreger aus der Niere eliminieren konnten (CORTESE et al., 2007). Der Einsatz von Tetracyclin oder Tilmicosin beseitigte den Stamm Hardjo-Bovis ebenfalls aus der Niere (ALT et al., 2001; DIRKSEN et al., 2002). Bei bereits einsetzender hämolytischer Krise oder manifester Organschädigungen ist eine Therapie meist erfolglos. Bei akuten oder subakuten Verläufen kann durch die Gabe von Penicillinderivaten oder Streptomycin sowie Bluttransfusionen eine Heilung erzielt werden (DIRKSEN et al., 2002). Bei kleinen Wiederkäuern steht vor allem die Elimination chronischer Trägartiere im Vordergrund. Chronisch infizierte Tiere sollten von der Herde getrennt und antibiotisch versorgt werden (LILENBAUM et al., 2009).

Obwohl Leptospiren bei Schweinen weltweit nachgewiesen werden können und das Schwein als wichtiger Reservoirwirt angesehen wird, (STRUTZBERG-MINDER et al., 2011) gibt es bis jetzt noch keine einheitlichen Maßnahmen für die Bekämpfung und die Eindämmung dieser Infektionskrankheit.

An Leptospirose erkrankte Pferde sollten isoliert werden und 5 bis 10 mg/kg Oxytetracyclin intramuskulär einmal pro Tag für eine Woche erhalten. Penicilline (10.000 bis 150.000 IE/kg) können auch eingesetzt werden, beenden jedoch nicht die Nierenbesiedlung. Dagegen eliminiert Streptomycin den Erreger aus der Niere (DIETZ et al., 2006). Daher werden auch häufig Penicilline in Kombination mit Streptomycin verwendet (HAMOND et al., 2012). Je nach Symptomatik können Diuretika und weitere unterstützende Maßnahmen eingeleitet werden (DIETZ et al., 2006). Bei der ERU sollte die initiale Therapie früh beginnen um das Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern (CURLING, 2011). Topisch wird Atropin für die Weitstellung der Pupille angewendet, steroidhaltige Augensalben gegen die Entzündungsreaktion gegeben, und systemisch ein nicht steroidales Antiflogistikum (NSAIDs) appliziert (CURLING, 2011; DIETZ et al., 2006). Enrofloxacin (7,5 mg/kg i.v. alle 24 Stunden) erreichte in Studien einen wirksamen, intraokulären Spiegel gegen *L. interrogans* Serovar Pomona (CURLING, 2011). Operativ kann durch eine Vitrektomie das Auftreten neuer Uveitisschübe verhindert werden (DIETZ et al., 2006).

6.3 Prophylaxe

Ido et al. gelang 1916 beim Meerschweinchen erstmals die Ausbildung einer schützenden Immunität gegen eine Infektion mit Leptospiren. Den Tieren wurden abgetötete Leptospiren intraabdominal appliziert. Eine anschließende experimentelle Infektion mit pathogenen *Leptospira* spp. schützte die meisten Tiere vor einer Erkrankung (IDO et al., 1916). Seitdem werden Impfstoffe aus inaktivierten Leptospiren, sogenannte Bakterine, routinemäßig prophylaktisch bei Tieren eingesetzt (LEVETT, 2001). Eine Impfung induziert eine serovarspezifische Immunität. Daher müssen die in den Impfstoffen enthaltenen Serovare der regionalen, epidemiologischen Situation angepasst sein (ADLER et al., 2010; SRIVASTAVA, 2006). Polyvalente Impfstoffe beinhalten mehrere Serovare die in einer bestimmten Region vorkommen. Beim Auftreten neuer Serovare muss der Impfstoff neu entwickelt werden (KO et al., 2009). Um einen anhaltenden Schutz zu erlangen, muss die Impfung jährlich erneuert werden. Weltweit sind kommerzielle Impfstoffe für Hunde, Rinder und Schweine erhältlich (Tabelle 4) (ADLER et al., 2010; LEVETT, 2001). In Deutschland sind zugelassene Impfstoffe für Hunde und Rinder vorhanden. Neben zahlreichen Kombinationsimpfstoffen für Hunde, die die Serovare Icterohaemorrhagiae und Canicola beinhalten, sind seit 2011 auch Impfstoffe erhältlich, die zusätzlich *L. kirschneri* Serovar Grippotyphosa enthalten (Tabelle 4). Die Impfung gegen Leptospirose ist eine sogenannte Core-Komponente und gilt laut Impfleitlinien der ständigen Impfkommision Veterinär (StIKo Vet.) als eine der Vakzinationen gegen die Hunde

immer geimpft sein sollten. Welpen bis zum Alter von 12 Wochen sollten eine dreimalige Impfung in der 8. und 12. Lebenswoche und im 15. Lebensmonat als Grundimmunisierung erhalten. Bei älteren Tieren besteht die Grundimmunisierung aus zwei Impfungen im Abstand von 2 bis 4 Wochen. Die Impfung sollte anschließend jährlich wiederholt werden. In Endemiegebieten wird sogar eine Impfung im Abstand von 6 Monaten empfohlen (STIKO VET., 2009). Die Vakzination schützt experimentell infizierte Hunde vor klinischen Erkrankungen und verhindert die Ausscheidung des Erregers mit dem Urin. Jedoch ist eine Übertragung des Serovars *Icterohaemorrhagiae* von immunisierten Hunden auf denen Menschen beschrieben (ADLER et al., 2010).

Impfungen beim Rind verhindern die Leptospirurie von nicht wirtsadaptierten Serovaren. Eine Immunisierung mit dem Serovar Hardjo induziert hohe AK-Titer, schützt aber nicht vor der renalen Kolonisierung. Nur Impfstoffe die spezifisch Typ1-T-Helferzellen (TH1) stimulieren verhindern kurzfristig die Ausscheidung des Erregers (ADLER et al., 2010; RINEHART et al., 2012; ZUERNER et al., 2011). In Deutschland ist ein Impfstoff für das Rind zugelassen (Tabelle 4).

Für Pferde ist momentan kein Impfstoff erhältlich (CURLING, 2011) und die Impfung ist auch nicht Bestandteil der Impfleitlinien (STIKO VET., 2011).

Bakterine werden beim Menschen in den letzten Jahren erfolgreich in China, Japan und Vietnam bei Expositionen große Bevölkerungszahlen mit Leptospiren nach Überflutungen eingesetzt (ADLER et al., 2010). Ein allgemein wirksamer Impfstoff gegen *Leptospira* spp., der keine Nebenwirkungen induziert, ist jedoch noch nicht entwickelt worden (GRASSMANN et al., 2012). Verschiedene Proteine pathogener *Leptospira* spp. wurden bereits als mögliche Kandidaten für die Entwicklung eines rekombinanten Impfstoffes untersucht. Getestet wurde die immunogene Wirkung verschiedener OMPs und Lips (Tabelle A1, Anhang). Vielversprechend war dabei die Verwendung von Lig-Proteinen (FELIX et al., 2011; GRASSMANN et al., 2012; KO et al., 2009; WANG et al., 2007). Von den untersuchten Proteinen sind jedoch wenige bereits in Tiermodellen validiert worden (ADLER et al., 2010; WANG et al., 2007). Eine aktuelle Studie mit einem rekombinanten LipL32, das an die B-Untereinheit des hitze-labilen Enterotoxins von *E. coli* gekoppelt ist, schützt Hamster nach erneuter Exposition mit einer letalen Dosis von *L. interrogans* vor einer letalen Erkrankung (GRASSMANN et al., 2012). Eine weitere prophylaktische Maßnahme ist die Reduktion von möglichen Expositionsquellen in der Umwelt. Dies ist aufgrund der weiten Verbreitung der Leptospiren in der Umwelt jedoch so gut wie unmöglich (ADLER et al., 2010; PAPPAS et al., 2006). Bei Reisen in endemische Regionen wird für den Menschen die prophylaktische Einnahme von Antibiotika empfohlen. 200 mg/wöchentliche orale Zufuhr von Doxycyclin schützt bei einer Infektion vor klinischen Symptomen (GUERRA, 2009).

Tabelle 4: Überblick über die in kommerziellen Vakzinen enthaltenen Serovare und die in Deutschland zugelassenen Impfstoffe

| Tierart | Serovar | ^a in Deutschland zugelassene Bakterine | Referenz |
|---------|--|--|--|
| Rind | Hardjo Pomona ^b Canicola, ^b Grippytyphosa ^b Icterohaemorrhagiae | Spirovac enthält <i>L. borgpetersenii</i> Serovar Hardjo (inaktiviert) | { (LEVETT, 2001); (ADLER et al., 2010); (ZUERNER et al., 2011) |
| Hund | ^c Canicola ^c Icterohaemorrhagiae ^c Grippytyphosa ^c Pomona | RIVAC SHPPi+3LT Kombinationsimpfstoff mit Adjuvans gegen canines Staupevirus (lebend), canines Adenovirus Typ 2 (lebend), canines Parvovirus (lebend), canines Parainfluenzavirus Typ 2 (lebend), Tollwutvirus (inaktiviert), Versican DHPPi/L3 Kombinationsimpfstoff mit Adjuvans gegen canines Staupevirus (lebend), canines Adenovirus Typ 2 (lebend), canines Parvovirus (lebend), canines Parainfluenzavirus Typ 2 (lebend) ^d Versican DHPPi/L3R Versican L3R Kombinationsimpfstoff mit Adjuvans gegen Tollwutvirus und Leptospiren | { (LEVETT, 2001); (ADLER et al., 2010); (MIDENCE et al., 2012) |
| Schwein | Pomona, Grippytyphosa, Bratislava, Canicola, Icterohaemorrhagiae | Kein Impfstoff zugelassen | { (ADLER et al., 2010) |

^a bezogen auf die Daten vom Paul-Ehrlich-Institut (www.pei.de)

Alle für den Hund aufgeführten Impfstoffe enthalten *Leptospira interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae (inaktiviert), *Leptospira interrogans* Serovar Canicola (inaktiviert) und *Leptospira kirschneri* Serovar Grippytyphosa (inaktiviert).

^b in Nordamerika zusätzlich enthaltene Serovare

^c in Europa, Australien und Südafrika enthaltene Serovare

^d wie Versican DHPPi/L3 aber zusätzlich mit Tollwutvirus (inaktiviert)

Die zahlreichen anderen zugelassenen Vakzine, die nur die Serovare Icterohaemorrhagiae und Canicola enthalten, sind nicht aufgeführt.

7 Diagnostik

7.1 Indirekter Erregernachweis

Die am häufigsten angewendete Methode zum Nachweis einer Leptospireninfektion ist der serologische Nachweis von spezifischen AK. Fünf bis sieben Tage nach dem Auftreten klinischer Symptome können AK gegen Leptospiren im Blut erfasst werden (TOYOKAWA et al., 2011). Als Goldstandard gilt momentan der MAT (Tabelle 6) (ALTON et al., 2009; GREENE, 2012; HARTSKEERL et al., 2011). Die im Test verwendeten Serovare sollten der epidemiologischen Situation der jeweiligen Region entsprechen. Die WHO empfiehlt, dass die Sammlung mindestens 19 Serovare umfassen sollte, welche 16 verschiedenen Serogruppen zugeordnet werden können. Dabei sollte ein Serovar der apathogenen Spezies *L. biflexa* verwendet werden, da Antikörper, die gegen pathogene Serovare gerichtet sind, mit den saprophytären Serovaren kreuzreagieren können (LEVETT, 2001; TOYOKAWA et al., 2011; WHO, 2003). Das vorverdünnte Patientenserum wird mit den lebenden Leptospiren-Kulturen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und weitere Verdünnungsstufen hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis drei Stunden bei 30 °C wird das Gemisch mittels Dunkelfeldmikroskopie auf Agglutinationsreaktionen überprüft. Als Endpunkt wird die höchste Verdünnungsstufe angesehen, bei der 50 % der Leptospiren agglutiniert vorliegen (TOYOKAWA et al., 2011). Entgegen der weit verbreiteten Meinung ist der Test serogruppenspezifisch und kann nicht das infizierende Serovar detektieren (GOLDSTEIN, 2010; GREENE, 2012; LEVETT, 2001). In der akuten Phase einer Infektion können sogenannte paradoxe Reaktionen entstehen, bei denen der höchste Titer gegen eine Serogruppe gerichtet ist, die nicht am Infektionsgeschehen beteiligt ist. Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion richtet sich der höchste Titer gegen das infizierende Serovar (GREENE, 2012). Zusätzlich kommt es in der frühen Phase der Infektion häufig zu Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Serogruppen, die mit der Dauer der Infektion jedoch abnehmen. Kreuzreaktionen entstehen dadurch, dass der MAT sowohl IgG- als auch IgM-AK erfasst und durch das Vorhandensein gemeinsamer AG bei Leptospiren (LEVETT, 2001). Falsch negative Ergebnisse können in den ersten fünf bis sieben Tagen p.i. auftreten, wenn noch keine AK gebildet wurden (LEVETT, 2001; MILLER et al., 2011). Daher ist es schwer, eine gesicherte Diagnose in der akuten Phase der Infektion mittels MAT zu stellen (TOYOKAWA et al., 2011). Eine sichere Diagnose mittels MAT ist nur möglich, wenn zwei Serumproben in einem bestimmten Zeitintervall untersucht werden. Dabei gilt ein vierfacher Anstieg des AK-Titers als gesicherter Hinweis für eine Infektion mit Leptospiren. Problematisch ist, dass der Cut-off-Wert nicht einheitlich definiert ist und in Abhängigkeit von

der gegebenen Situation interpretiert werden muss (Tabelle 5). Beispielsweise können AK gegen Leptospiren noch Monate oder Jahre nach einer Infektion nachweisbar bleiben und so mit der Diagnose einer akuten Infektion kollidieren (TOYOKAWA et al., 2011). Auch eine Differenzierung zwischen einer Infektion und einer Impfung ist kompliziert, da die durch die Immunisierung induzierten AK die Interpretation der MAT-Ergebnisse erschweren können (MILLER et al., 2011; VAN, I et al., 2008). Direkt nach einer Impfung können bei Seren von Hunden AK-Titer von 1:1600 gemessen werden (Tabelle 5) und bis zu drei Monaten bestehen bleiben bevor der AK-Titer sinkt (MILLER et al., 2011). Basierend auf der subjektiven Interpretation des MAT können die Ergebnisse des Tests in verschiedenen Laboren und je nach durchführendem Personal variieren (CHAPPEL et al., 2004). In einer Studie unterschieden sich die Ergebnisse so stark, dass nicht auf die infizierende Serogruppe geschlossen werden konnte (MILLER et al., 2011). Daher wird die Anwendung eines einheitlichen Prüfschemas, wie es von Chappel et al. beschrieben ist, und von der International Leptospirosis Society (ILS) angeboten wird, für die durchführenden Labore verlangt, um eine weltweite standardisierte Anwendbarkeit zu gewährleisten (CHAPPEL et al., 2004; HARTSKEERL et al., 2011; MILLER et al., 2011; SYKES et al., 2011).

Tabelle 5: Interpretation verschiedener MAT Cut-off-Werte

| Titer | Situation | Interpretation | Referenz |
|--------------|---|--|---|
| 1:100 | Mensch mit schweren klinischen Symptomen aus nicht endemischer Region | hinweisend auf eine Infektion | { (SYKES et al., 2011; TOYOKAWA et al., 2011) |
| 1:400 | Mensch aus endemischer Region | hinweisend auf eine Infektion | |
| 1:1600 | Mensch aus endemischer Region | empfohlener Titer zum Nachweis einer Infektion | |
| 1:400 | AK-Titer geimpfter Hunde; höhere Titer können bis zu drei Monaten nach einer Impfung bestehen bleiben | Titer von 1:1600 sollten als hinweisend für eine Infektion angesehen werden, vor allem bei unbekanntem Impfstatus des Hundes | { (MILLER et al., 2011; SYKES et al., 2011) |

Aufgrund der Komplexität des MAT sind zahlreiche Schnelltests für die Detektion von Leptospiren-AK entwickelt worden. Spezifische IgM-AK können bereits in der ersten Woche p.i. nachgewiesen werden und ermöglichen daher eine frühe Diagnosestellung und eine frühe Einleitung der Therapie. Daher gibt es eine Vielzahl verschiedener IgM-ELISAs (LEVETT, 2001). Durch die Anwendung eines kombinierten IgG- und IgM-ELISA kann besser zwischen

infizierten und vakzinierten Tieren unterschieden werden, da IgG-AK typischerweise bei einer Impfung stark ansteigen und über Monate konstant hohe Titer aufweisen. Kommerziell erhältliche Testsysteme basieren auf Ganzzelllysaten von Leptospiren. Dazu zählen ELISAs, Teststreifen, indirekte Hämagglutinations-Tests und Latexagglutinationstests (Tabelle 6) (GREENE, 2012). Wie der MAT besitzen auch diese Testsysteme eine geringe Sensitivität in der akuten Phase der Erkrankung und sollten erst ab dem zehnten Tag p.i. eingesetzt werden. Zusätzlich ist die Verwendung in endemischen Regionen schwierig, da IgM-AK lange nachweisbar bleiben, ständige Neuinfektionen den Antikörperspiegel aufrechterhalten und andere Erreger kreuzreagieren können. Auch Kreuzreaktionen mit apathogenen Leptospiren sind beschrieben, da eine bestimmte Zuckerabfolge im LPS sowohl bei apathogenen wie pathogenen Leptospiren vorkommt (TOYOKAWA et al., 2011). Um eine höhere Sensitivität und Spezifität zu erlangen, wurden IgM-ELISAs entwickelt, die spezifische Oberflächenproteine pathogener Leptospirenstämme als AG verwenden. Der Einsatz verschiedener rekombinanter Proteine wie der IgM-ELISA für rLipL32 (r = rekombinantes), rLipL41 und rOmpL1 variierten in ihrer Sensitivität und Spezifität (ADLER et al., 2010; TOYOKAWA et al., 2011). Ein neues IgM-ELISA-Testsystem beruht auf einem fusionierten Protein für rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 als AG. Bei der Untersuchung von 493 Patientenseren konnte damit eine Sensitivität von 97,8 % und eine Spezifität von 100 % erlangt werden. Die Sensitivität konnte dabei im Vergleich zu den anderen rekombinanten Testsystemen verbessert werden (SUN et al., 2011). Auch Lig-Proteine werden als diagnostische Marker für eine frühe Diagnose einer Infektion mit Leptospiren angesehen (CRODA et al., 2007). Im Vergleich zu den ELISA-Testsystemen gilt der MAT jedoch als der serologische Test mit der höchsten Sensitivität und Spezifität. Daher wird der alleinige Nachweis von *Leptospira* spp. mittels ELISA momentan nicht empfohlen (ADLER et al., 2010; GREENE, 2012).

7.2 Direkter Erregernachweis

Alle direkten Nachweismethoden ermöglichen nur bei einem positiven Ergebnis eine gesicherte Diagnose einer Leptospireninfektion. Bei einem negativen Ergebnis kann, aufgrund der niedrigen Sensitivität des AG-Nachweis, eine Infektion nicht sicher ausgeschlossen werden (STIKO VET., 2009). Der klassische Erregernachweis ist die kulturelle Anzucht von Leptospiren aus klinischen Proben. Problematisch ist die langsame Wachstumsrate von *Leptospira* spp. sowie die Gefahr falsch negativer Befunde durch Kontaminationen des Probenmaterials oder durch eine geringe Erregerlast in der Probe. Eine kulturelle Anzucht kann

erst nach drei bis sechs Monaten sicher als negativ angesehen werden. Daher ist diese Methode nicht für die Diagnostik einer Leptospirose geeignet (ADLER et al., 2010; SYKES et al., 2011; TOYOKAWA et al., 2011). Um 1990 begann man vermehrt molekularbiologische Nachweismethoden zu entwickeln. In den ersten zwei Wochen p.i. können während der Leptospirämie 10^7 Bakterien/ml im Blut vorhanden sein. In dieser Phase kann Leptospiren-DNA mittels der PCR detektiert werden (CERQUEIRA et al., 2009). Daher gilt die PCR als die Nachweismethode für die frühe Phase einer Infektion mit *Leptospira* spp. (BROWN et al., 1995; DE ABREU et al., 2006; FONSECA et al., 2006). Die Menge der DNA im Blut nimmt im Laufe der Infektion ab. Die Sensitivität dieser Nachweismethode geht daher mit anhaltendem Infektionsgeschehen zurück. Verschiedene konventionelle und real-time-PCR-Systeme sind für den Nachweis von Leptospiren-DNA aus Blut, Urin, Zerebrospinalen Liquor und Geweben entwickelt worden (Tabelle 6). Detektierte Gene sind unter anderem *rrs*, *flaB*, *rrl*, *secY*, *ligA* und *ligB* (TOYOKAWA et al., 2011). Kaum eines der entwickelten PCR-Systeme ist jedoch bisher in klinischen Studien validiert worden (ADLER et al., 2010). Trotzdem gilt die PCR als die genaueste Nachweismethode bei einer akuten Infektionen (DE ABREU et al., 2006; GREENE, 2012). Anhand der entwickelten PCR-Systeme kann meist nur zwischen pathogenen und apathogen Leptospiren unterschieden werden. Nur das Gen *secY* (preprotein translocase *secY*) ermöglicht die Differenzierung bis auf Speziesebene (CERQUEIRA et al., 2009). Robustere Methoden wie restriction fragment length polymorphism (RFLP), 16S-rRNA-Sequenzierungen sowie variable number of tandem repeats (VNTR) wurden etabliert. Vor allem das multi locus sequence typing (MLST) ermöglicht eine sichere, differenzierte Charakterisierung von Leptospirenisolaten anhand mehrerer Genloci gleichzeitig (ADLER et al., 2010). Diese Methode kann für die Identifizierung von Leptospirenisolaten sowie für den Nachweis evolutionsbedingter Unterschiede einzelner Stämme eingesetzt werden (siehe Abschnitt 9) (AHMED et al., 2006).

Tabelle 6: Gebräuchliche Testsysteme für die Diagnose der Leptospirose

| Test | ^{a,b,c} Sensitivität | ^{a,b} Spezifität | Vorteile | ^d Nachteile | Referenz |
|------------------------------|--------------------------------|---|---|--|---|
| Kultur | 5 bis 50 % | 100 % | sichere Diagnose bei positiver Kultur | zu aufwendig und zeitintensiv | { (LEVETT, 2001); (WHO, 2003); |
| Dunkelfeld-mikroskopie | 10 ⁴ Leptospiren/ml | niedrig, Gefahr der Verwechslung mit Proteinbestandteilen | schnelle und frühe Diagnose; in Human- und Veterinärmedizin anwendbar | Befund muss bestätigt werden | { (LEVETT, 2001); (WHO, 2003) |
| MAT | 90 % | > 90 % | Gold Standard; in Human- und Veterinärmedizin anwendbar | aufwendig schwer zu interpretieren; Problem: serologisch negative Trägartiere, Impfungen, falsch negative Ergebnisse in der akuten Phase | { (LEVETT, 2001); (WHO, 2003) |
| IgM-ELISA | > 90 % | 88 % bis 95 % | günstig und schnell | serologischer Test | (WHO, 2003) |
| IgG-ELISA für Rinder | circa 90 % | 95 % | schnell | falsch negativ in der frühen Phase der Immunantwort | (YAN et al., 1999) |
| DriDot (Latex agglutination) | 82 % | 95 % | günstig und schnell | serologischer Test; Bestätigung durch MAT nötig; nur in Humanmedizin | (WHO, 2003) |
| Lateral Flow Test | 81 % | 96 % | günstig und schnell | serologischer Test; Bestätigung durch MAT | (WHO, 2003); |
| Real time PCR | 100 % | 93 % | frühe Diagnose; in Human- und Veterinärmedizin anwendbar | Erfahrung notwendig; teure Ausstattung; nur zwei PCR-Systeme validiert | { (WHO, 2003); (MCBRIDE et al., 2007); (SLACK et al., 2007); (AHMED et al., 2009); |

basierend auf Hartskeerl et al. (HARTSKEERL et al., 2011)

^a Unterschiede bei den Prozentangaben in verschiedenen Studien

^b die Sensitivität und Spezifität ist von multiplen Faktoren wie Krankheitsverlauf, verwendetes Testmaterial und Testsystem abhängig

^c der MAT sollte als Goldstandard eine Sensitivität von 100 % besitzen und ist daher nicht optimal

^d bei serologischen Tests werden AK erst 7 bis 10 Tage nach dem Einsetzen klinischer Symptome detektiert. Die antibiotische Versorgung sollte jedoch innerhalb der ersten vier Tage erfolgen

8 Massenspektrometrie als Nachweisverfahren

8.1 MALDI-TOF-MS-Technologie

Lange Zeit konnte die Massenspektrometrie (MS) nur für die Analyse von Atomen oder großen Molekülen verwendet werden, da die Ionisierung der Proben zu unkontrollierbaren Veränderungen in der chemischen Struktur der Analyten führte (SAUER et al., 2010; VESTAL, 2011). Im Jahr 1988 beschrieben Karas und Hillenkamp erstmals eine neue Ionisierungstechnik die keine Strukturänderungen der Moleküle mehr verursachte (KARAS et al., 1988). Mit der Einführung des matrix assisted laser desorption ionization (MALDI)-Prinzips konnten zum ersten Mal große Moleküle wie Proteine und DNA-Oligomere anhand ihrer Größenunterschiede differenziert werden (VESTAL, 2011). Mit der Weiterentwicklung massenspektrometrischer Verfahren in den späten 80er Jahren konnten Peptide und Proteine in biologischen Materialien analysiert werden (SAUER et al., 2010). Lange Zeit wurde MS nur für die Charakterisierung von Proteinen, Lipiden und Zuckern verwendet. Für den Einsatz in der Mikrobiologie war die Technologie lange mit einem zu großen Aufwand verbunden. Erst im Jahr 1996 wurde das Prinzip des MALDI-TOF MS erstmals für die Differenzierung ganzer Zellen von grampositiven und gramnegativen Bakterien angewendet, ohne dass die Proteine der Bakterienzelle vorher extrahiert wurden (CLAYDON et al., 1996). MALDI-TOF MS wird seither für die Identifizierung von Bakterien in der Routinediagnostik und der taxonomischen Einteilung von Mikroorganismen verwendet (WELKER (2), 2011). Dabei werden Bakterienzellen anhand der Unterschiede ihrer Proteinmassen differenziert, die durch ein Massenspektrometer erfasst werden (STEPHAN et al., 2010).

Ein Massenspektrometer besteht aus drei Hauptelementen. Dazu zählt eine Ionenquelle, in der die Analyten geladen werden und in die Gasphase übergehen, ein Analysator in dem die Ionen nach ihrem Massen- und Ladungsverhältnis (m/z = mass-to-charge ratio) aufgetrennt werden und einem Detektor der die Ionen analysiert (SAUER et al., 2010). Kleinere Proteine werden dabei schneller beschleunigt als große Proteine. Da die Ladung der Ionen meist $z = 1$ beträgt werden die Ionen nur nach ihren unterschiedlichen Massenverhältnissen aufgetrennt (ALBRETHSEN, 2007; CLAYDON et al., 1996).

MALDI-TOF MS differenziert die Bakterienproben anhand der Unterschiede in ihren individuellen Proteinprofilen. Für die Differenzierung von Bakterienzellen werden die Proben nach einem standardisierten Protokoll vorbereitet und auf eine Metallplatte, dem sogenannten

Target, aufgetragen (Abbildung 7) und anschließend mit einer Matrix überschichtet. Die Matrix ist eine gesättigte, saure Lösung. Durch das Auftragen auf die Bakterienprobe wird die Probe mit der Matrix kokristallisiert (CARBONNELLE et al., 2011). Für die Routinediagnostik wird am häufigsten die sogenannte α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), eine Lösung bestehend aus Zimtsäure und anderen Komponenten, als Matrix verwendet. Das mit den so präparierten bakteriellen Proben bestückte Target wird anschließend in das MALDI-TOF-Analysegerät eingelegt (WIESER et al., 2011).

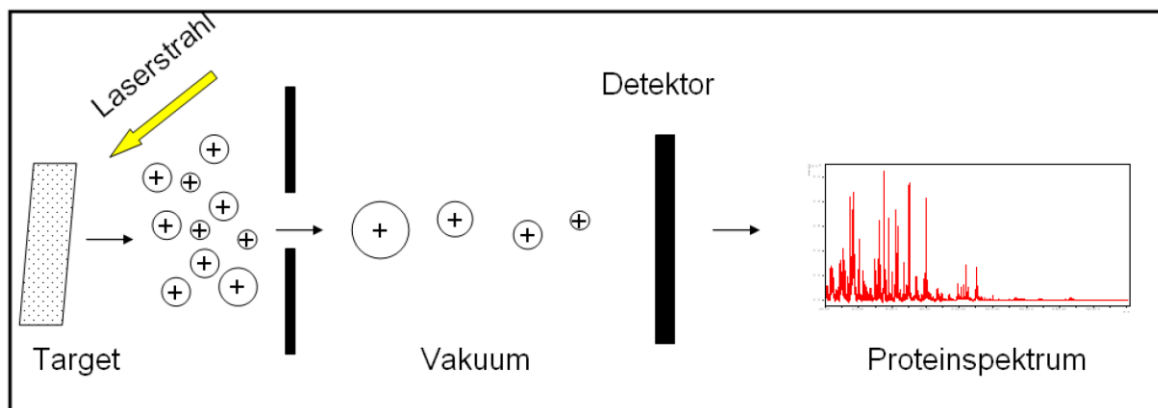


Abbildung 7: Aufbau und Funktion des MALDI-TOF MS

- ⊕ einfach positiv geladenes Ion das im Vakuum beschleunigt wird
 Die in der Bakterienprobe enthaltenen Proteine werden durch einen definierten Laserimpuls ionisiert und anschließend in einem Vakuum anhand ihrer unterschiedlich langen Flugzeiten nach ihrer Größe aufgetrennt. Die so erfassten Größenunterschiede der Proteine werden dann computerbasiert als Proteinspektrum visuell dargestellt.

Die kristallisierte Probe wird dann innerhalb eines Vakuums einem definierten Laserimpuls ausgesetzt. Die durch den kurzen Laserimpuls freiwerdende Energie wird von der Matrix absorbiert und die Proteine der Probe werden ionisiert und freigesetzt. Die Ionen werden in einem Magnetfeld auf einer definierten Strecke beschleunigt und anschließend in einer Vakuumröhre nach ihrer Größe aufgetrennt. Die unterschiedlichen Zeiten, welche die Ionen auf der Flugstrecke bis zum Erreichen des Detektors benötigen, werden erfasst und bilden so die Basis für die Proteinidentifikation (Abbildung 7). Diese Unterschiede ergeben für jede Bakterienspezies einen spezifischen Fingerabdruck, der sich anhand eines charakteristischen Proteinspektrums darstellen lässt (CARBONNELLE et al., 2011; CLAYDON et al., 1996; DHIMAN et al., 2011; WIESER et al., 2011). Die dabei entstehenden Proteinprofile bestehen aus einzelnen Proteinpeaks (Abbildung 8). Die x-Achse gibt dabei die Proteingröße in Dalton (Da) an, die y-Achse gibt die Peak-Intensität wieder (ALBRETHSEN, 2007).

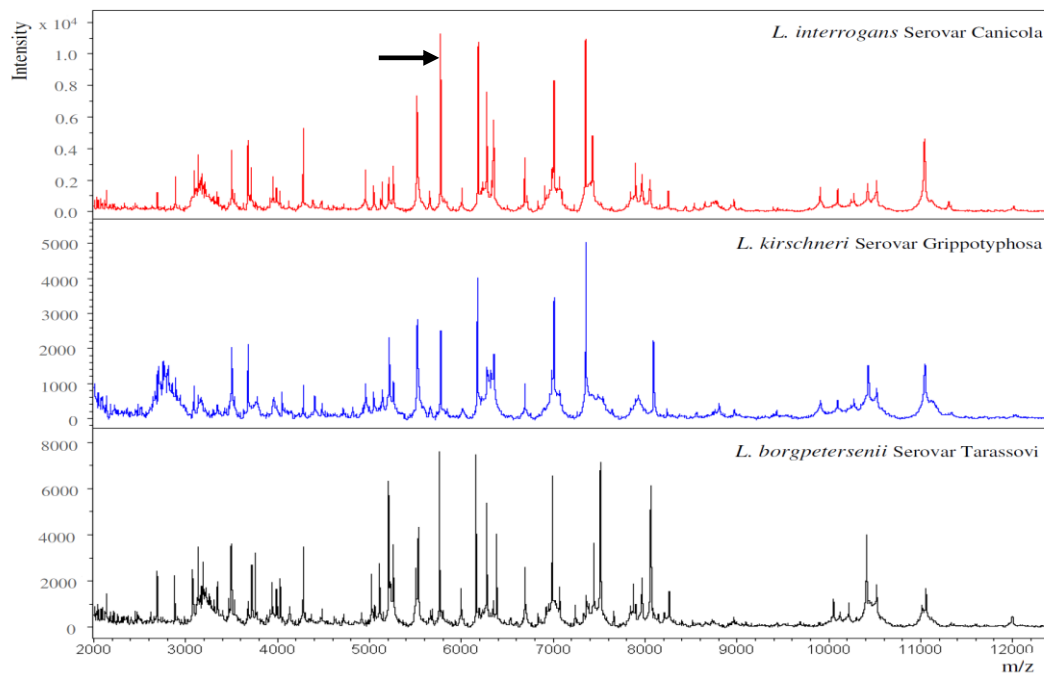


Abbildung 8: Proteinspektren von drei verschiedenen Genospezies von *Leptospira* spp.

Die x-Achse gibt die Masse- und Ladungsverhältnisse (m/z = mass-to-charge ratio) der Proteine an. Da die Ladung $z = 1$ beträgt werden die Proteine nur ihrer Größe nach aufgetrennt. Die so erfasste Proteingröße wird dabei in Dalton (Da) angegeben.

Die y-Achse gibt die Häufigkeit eines Ions in der gemessenen Probe als Intensität an (ALBRETHSEN, 2007)

Pfeil (→) Proteinpeak innerhalb eines Proteinspektrums

8.2 Anwendung des MALDI-TOF MS für die Identifizierung von Bakterien

Die Identifizierung von Bakterienproben mittels MALDI-TOF MS beruht auf drei Grundprinzipien. Dafür müssen die zu untersuchenden Mikroorganismen erstens Unterschiede in ihren Proteinprofilen aufweisen, zweitens müssen konservierte Proteinpeaks innerhalb der Spektren vorhanden sein, die eine Differenzierung auf Genus- Spezies- oder Subspeziesebene ermöglichen und die generierten Spektren müssen drittens reproduzierbar sein (CARBONNELLE et al., 2011). MALDI-TOF MS erfasst stabil exprimierte Haushaltsproteine. Von den insgesamt 200 detektierten Proteinpeaks können 50 Peaks ribosomalen Proteinen zugeordnet werden. Die restlichen Peaks entsprechen verschiedenen Strukturproteinen (WELKER (1) et al., 2011). Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, muss sowohl die Anzucht als auch die Präparation der Bakterienkulturen standardisiert ablaufen (CARBONNELLE et al., 2011; FENSELAU et al., 2001). Es können sowohl Bakterien von flüssigen als auch von festen Nährmedien für die Untersuchung verwendet werden. Dabei ist zu beachten, dass nur Kulturen mit vitalen Bakterien, die sich in der Wachstums- oder

Stationärenphase befinden, verwendet werden dürfen, da die Proteine der Probe nur in diesen Phasen stabil exprimiert werden. Zudem ist für eine erfolgreiche Messung eine Mindestzahl von 10^5 bis 10^7 Bakterienzellen pro Messung notwendig um eine genügend hohe Proteindichte zu erhalten. Kontaminationen oder Mischkulturen führen zu qualitativ minderwertigen Massenspektren, die keine sichere Speziesidentifikation erlauben. Daher sollte für die weitere Bearbeitung nur eine Reinkolonie pro zu messenden Spot verwendet werden (FREIWALD et al., 2009). Für die Proteinextraktion stehen, je nach verwendetem Ausgangsmaterial, verschiedene Protokolle zur Verfügung. Die am häufigsten angewendete Methode ist der direkte Transfer einer Bakterienkolonie auf einen Spot des Targets. Die anschließende Überschichtung mit der Matrix inaktiviert die Bakterienzellen. Für anspruchsvollere Keime oder hochpathogene Erreger und Sporenbildner werden die Ethanol-Ameisensäure-Extraktion oder die Trifluoressigsäure-Extraktion empfohlen. Für Erstere ist eine höhere Dichte von 10^6 bis 10^7 Bakterienzellen notwendig (FREIWALD et al., 2009). Allgemein gilt, dass mit extrahierten Proben qualitativ bessere Spektren generiert werden können als mit direkt geschmierten Proben. Die gemessenen Spektren werden anschließend softwarebasiert mit denen in einer Referenzdatenbank hinterlegten Proteinspektren abgeglichen (ALATOOM et al., 2011). Diese umfasst eine große Anzahl (derzeit 4642) klinisch relevanter bakterieller Isolate. Für den Abgleich wird ein numerischer Wert, der sogenannte score value, errechnet und so die Übereinstimmung des gemessenen Analyten mit dem Spektrum in der Datenbank analysiert. Je nach errechnetem Wert ist eine sichere Differenzierung auf Genus- oder Speziesebene möglich (WIESER et al., 2011). Die Reproduzierbarkeit eines Ergebnisses hängt dabei vor allem von der Qualität der Referenzdatenbank ab. Dazu sollte für jede hinterlegte Spezies ein Massenspektrum vorhanden sein, wobei eine Spezies von mehreren Stämmen in der Datenbank repräsentiert werden sollte (WELKER (2), 2011). Empfohlen werden mindestens zehn Stämme pro Spezies (ROSSELLO-MORA et al., 2001). Durch die Aufnahme mehrerer Spektren einer Spezies in die Datenbank können die Unterschiede nahe verwandter Arten besser dargestellt und dadurch bessere Ergebnisse erzielt werden (ALATOOM et al., 2011).

Momentan wird MALDI-TOF MS als die schnellste, genaueste und günstigste Methode für die Analyse intakter Bakterienzellen in der Routinediagnostik angesehen (CARBONNELLE et al., 2011). MALDI-TOF MS ist vor allem für die zahlreichen unbekannten oder schlecht charakterisierten Mikroorganismen relevant, die ursächlich für viele Erkrankungen sind und bei 64 % der tödlich verlaufenden Krankheiten isoliert werden. In kürzester Zeit können dabei Proben mit einer hohen Sensitivität und Spezifität analysiert werden (FREIWALD et al., 2009). In einer

ersten breiten Untersuchung von 1.660 Bakterienstämmen konnten 84 % der Bakterienproben korrekt auf Speziesebene und 11 % auf Genusebene bestimmt werden (SENG et al., 2009). Neben der Differenzierung von Bakterien aus vorangereicherten Kulturen gelingt auch der direkte Erregernachweis aus klinischen Materialien. Aus Blutkulturen kann der Erreger erfolgreich bis auf Spezies- oder Genusebene erfasst werden. Die Spezifität variiert dabei je nach Studie und Präparationsmethode zwischen 31,8 % bis 95 %. Ähnliche Ergebnisse konnten mit Urinproben erreicht werden (CARBONNELLE et al., 2011; FERREIRA et al., 2010). Die beschriebene Methode kann neben der Charakterisierung von Bakterien auch für Hefen und Pilze verwendet werden (CARBONNELLE et al., 2011).

Die MALDI-TOF-MS-Technologie stößt jedoch bei der Differenzierung nah verwandter Bakterienarten an ihre Grenzen (WELKER (2), 2011). Dies liegt vor allem daran, dass eng verwandte Arten sehr große Homologien in ihren Proteinspektren aufweisen und die Differenzierung der Subspezies oder des Bakterienstammes auf nur geringen Unterschieden in den Proteinmassen beruht (SAUER et al., 2010; TERAMOTO et al., 2007). Ohne weiterführende Analyse der Proteinspektren ist die Unterscheidung einiger Bakterienspezies mittels MALDI-TOF MS schwierig. Daher wird die Differenzierung von Bakterienstämmen momentan noch nicht in der Routinediagnostik angewendet, da neben einem hohen Zeitaufwand auch zusätzliche Softwareprogramme, wie ClinProTools (Bruker Daltonik GmbH, Bremen), vorhanden sein müssen, die eine Identifikation geringer Unterschiede der Proteinmassen einzelner Peaks bei verschiedenen Bakterienstämmen ermöglichen (DRAKE et al., 2011). In der Routinediagnostik ist daher momentan die Unterscheidung von *Shigella* sp. und *E. coli* schwierig, die mittels einfacher Speziesdifferenzierung nicht gelingt (BIZZINI et al., 2010). Die mangelnde Differenzierbarkeit ist dabei auf die enge phylogenetische Verwandtschaft von *Shigella* sp. zu den enteroinvasiven *E.-coli*-Stämmen zurückzuführen (WELKER (2), 2011). Problematisch ist auch die Separierung von Streptokokken und Pneumokokken. Auch *Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae* können nicht mittels MALDI-TOF MS differenziert werden (BLONDIAUX et al., 2010; SENG et al., 2009; VAN VEEN et al., 2010). Eine falsche Klassifizierung kann jedoch schwerwiegende Konsequenzen für den Patienten nach sich ziehen (CARBONNELLE et al., 2011), da Vertreter der *Streptococcus mitis* Gruppe Resistenzen gegen Penicilline besitzen und daher Infektionen mit Erregern dieser beiden Gruppen unterschiedlich antibiotisch versorgt werden müssen (WERNO et al., 2012). Neben den bereits angesprochenen geringen Unterschieden in den Proteinspektren nahe verwandter Bakterienstämme können Missklassifizierungen auch dann auftreten, wenn für die Bakterienspezies keine oder nur wenige Einträge in der Datenbank vorhanden sind (VAN VEEN et al., 2010). Regelmäßige Erneuerungen

sowie die Ergänzung fehlender Stämme in der Datenbank sind daher essentiell für die Qualität des Abgleichs. Auch der Einsatz eines Expertenkomitees für die Qualitätskontrolle der Referenzdatenbanken wird empfohlen (BLONDIAUX et al., 2010). Verglichen mit herkömmlichen, aufwendigen Analysemethoden bietet MALDI-TOF MS jedoch eine schnelle und spezifische Analyse der zu untersuchenden Proben in der bakteriologischen Routinediagnostik (AYYADURAI et al., 2010; BENAGLI et al., 2011). Dabei ist die breite Anwendbarkeit der Probenbearbeitung für verschiedene Bakterienstämme von Vorteil. Im Vergleich zu herkömmlichen molekularbiologischen Methoden muss das Protokoll nicht für jede Bakterienspezies neu entwickelt und optimiert werden (BENAGLI et al., 2011; FREIWALD et al., 2009).

8.3 Phylogenetische Differenzierung von Bakterien mittels MALDI-TOF MS

Die momentane Taxonomie der Bakterien basiert auf aufwendigen Sequenzierungen ganzer Bakteriengenome oder Teilsequenzen bestimmter Gene. Vor allem die Analyse des bei Prokaryoten ubiquitär vorhandenen 16S-rRNA-Gens wird als Goldstandard angesehen. MALDI-TOF MS ermöglicht eine, mit bisherigen Gensequenzierungen, vergleichbare Klassifizierung von Bakterien (WELKER (1) et al., 2011). In einer Untersuchung von 545 verschiedenen klinischen Isolaten des Genus *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Staphylococcus* und *Streptococcus* konnte eine übereinstimmende Speziesidentifizierung mittels 16S-rRNA-Sequenzierung und MALDI-TOF MS-Analyse erreicht werden (BENAGLI et al., 2011).

Die mit MALDI-TOF MS erfassten Unterschiede einzelner Proteinpeaks der Proteinprofile entsprechen Variationen in den Aminosäuresequenzen der analysierten Haushaltsgene (FREIWALD et al., 2009). Die Stabilität der erfassten Proteine wird dadurch sichergestellt, dass nur Proteine in der Größe zwischen 3.000 bis 20.000 Da analysiert werden, die bei sich exponentiell teilenden Bakterienzellen stabil exprimiert sind (WELKER (2), 2011). Proteinreferenzspektren (MSP, main spectral projection) der analysierten Bakterienproben können mit der Software automatisch in einem Dendrogram dargestellt werden (Abbildung 9), in dem die Bakterienspezies separiert wird. Basierend auf den Unterschieden der Proteinmassen im Bereich zwischen 3.000 und 15.000 Da und der Intensität der Proteinpeaks der untersuchten MSPs werden Distanzwerte errechnet. Dabei gelten Spezies ab einem Distanzwert von 500 als sicher klassifiziert (FREIWALD et al., 2009). Um sicher zu stellen, dass die phylogenetische Differenzierung mittels der noch neuen MALDI-TOF-MS-Technik mit herkömmlichen, molekularbiologischen Methoden vergleichbar ist, sollten die Ergebnisse immer anhand etablierter Techniken verglichen werden (MURRAY, 2010).

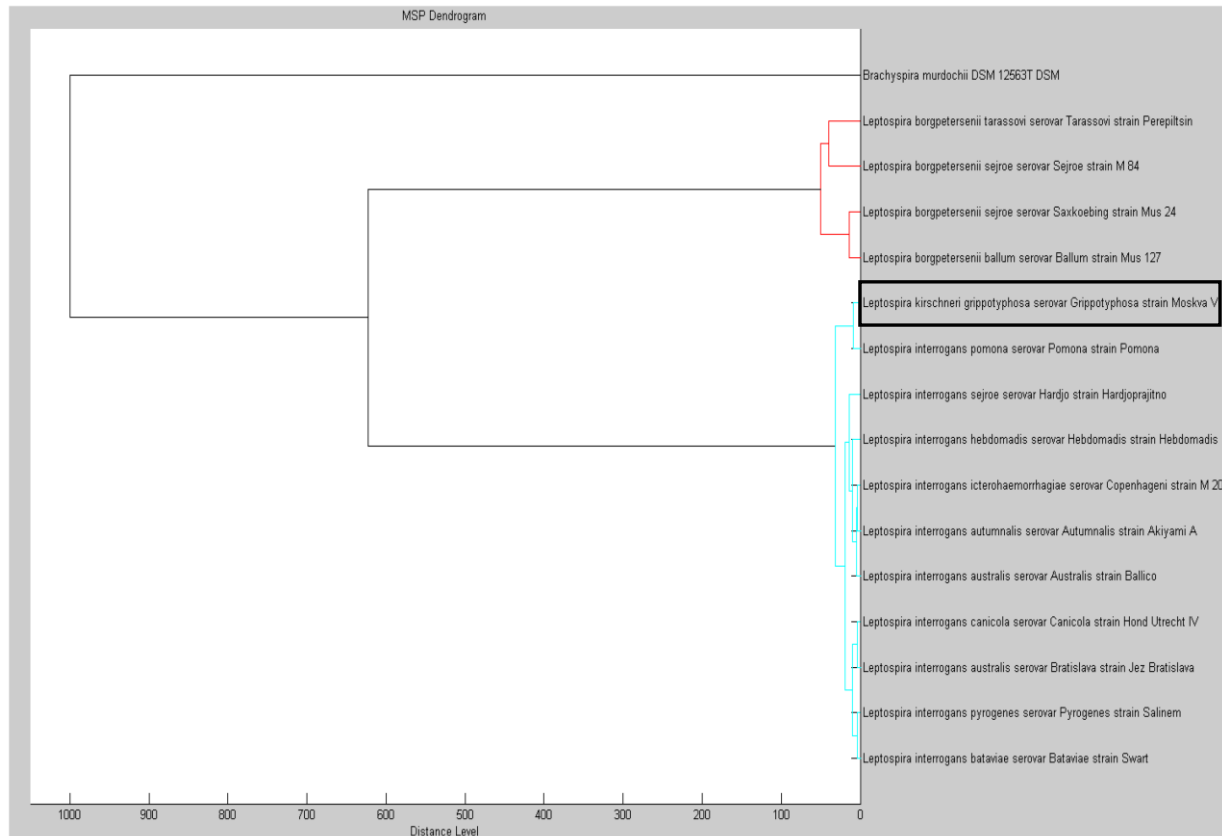


Abbildung 9: MSP Dendrogram pathogener *Leptospira* spp.

Das Dendrogram stellt die Referenzspektren der zu den drei Genospezies *L. interrogans* (blau) *L. kirschneri* (blau) und *L. borgpetersenii* (rot) gehörenden Leptospirenstämme dar. Das Proteinspektrum von *L. kirschneri* ist durch einen Rahmen hervorgehoben. Als Außengruppe wurde das Referenzspektrum von *Brachyspira murdochii* aus der Referenzdatenbank von Bruker Daltonik verwendet.

9 Genotypisierung von *Leptospira* spp. mittels MLST

Mit der Verfügbarkeit kompletter Genomsequenzen von Leptospiren (siehe 1.3) wurden vermehrt molekularbiologische Typisierungsmethoden für die Differenzierung und Charakterisierung von *Leptospira* spp. entwickelt. Das MLST beruht auf der Detektion von Allelvariationen in den analysierten Genen (AHMED et al., 2006). Prinzipiell werden dabei Unterschiede in den Nucleotidsequenzen der ausgewählten Haushaltsgene erfasst (MAIDEN, 2006). Da sich Haushaltsgene über die Zeit sehr wenig verändern, ist das MLST eine robuste und reproduzierbare Methode, die häufig für epidemiologische Studien verwendet wird (ROMERO et al., 2011).

Für die Genotypisierung von *Leptospira* spp. sind momentan zwei etablierte MLST-Systeme verfügbar (AHMED et al., 2006; THAIPADUNGPANIT et al., 2007). Im Jahr 2006 entwickelten Ahmed et al. ein MLST-System, welches auf sechs Genen (Tabelle 7) beruht, die auf dem

Chromosom 1 im Genom von *L. interrogans* lokalisiert sind. Neben Haushaltsgenen kodieren die Gene auch für Strukturproteine der äußeren Membran. Die ausgewählten Gensequenzen der verwendeten Gene *adk*, *icdA* und *secY* weisen dabei größere Variationen auf wie die der anderen drei Gene. Mittels des etablierten MLST-Systems können alle analysierten Stämme der pathogenen Genospezies *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. weilii* und *L. noguchii* sicher bis auf Ebene der Genospezies differenziert werden. Darüber hinaus stimmt die phylogenetische Separierung mit der bereits bekannten taxonomischen Einteilung der Leptospirenstämme überein (AHMED et al., 2006).

Für die Identifizierung humaner klinischer Isolate, die bei einem Leptospiroseausbruch in Thailand gewonnen wurden, konnte ein MLST für die Genotypisierung von *L. interrogans* und *L. kirschneri* entwickelt werden. Insgesamt werden hier sieben Haushaltsgene verwendet (Tabelle 7) die ebenfalls mit Ausnahme des Gens *fadD*, auf dem Chromosom 1 im Genom von *L. interrogans* lokalisiert sind (THAIPADUNGPANIT et al., 2007).

Tabelle 7: Verwendete Gene der beiden etablierten MLST-Systeme für die Genotypisierung von pathogenen Leptospiren

| Gen | Funktion | Allelanzahl | Basierend auf |
|---------------|---|-------------|--------------------------------|
| <i>adk</i> | Adenylat Kinase | 10 | (AHMED et al., 2006) |
| <i>icdA</i> | Isocitrat Dehydrogenase | 12 | |
| <i>rrs2</i> | 16S rRNA | 6 | |
| <i>secY</i> | Translocase Präprotein secY | 20 | |
| <i>LipL41</i> | Lipoprotein LipL41 der äußeren Membran | 7 | |
| <i>LipL32</i> | Lipoprotein LipL32 der äußeren Membran | 7 | |
| Gen | Funktion | Allelanzahl | Basierend auf |
| <i>pntA</i> | NAD(P) Transdehydrogenase Untereinheit α | 11 | (THAIPADUNGPANIT et al., 2007) |
| <i>sucA</i> | 2-Oxoglutarat Dehydrogenase | 7 | |
| <i>pfkB</i> | Ribokinase | 14 | |
| <i>glmU</i> | UDP-N-Acetylglucosamin Pyrophosphorylase | 11 | |
| <i>mreA</i> | Rod shape-determining Protein rodA | 12 | |
| <i>tpiA</i> | Triosephosphat Isomerase | 10 | |
| <i>fadD</i> | Langkettige Fettsäuren-CoA Ligase | 7 | |

Die Gene sind auf dem Chromosom 1 im Genom von *L. interrogans* lokalisiert. Das Gen *fadD* liegt auf dem Chromosom 2.

Bei einem direkten Vergleich der beiden MLST-Systeme stimmten die Ergebnisse für die analysierten Leptospirenstämme der Genospezies *L. interrogans* und *L. kirschneri* überein (AHMED et al., 2011).

MLST ist eine sichere und robuste Methode für die Identifizierung und Genotypisierung von pathogenen Leptospiren und kann für die Typisierung von Kulturstämmen und für die Identifizierung von klinischen Isolaten verwendet werden (NALAM et al., 2010).

III. PUBLIKATION

Rettinger et al. *BMC Microbiology* 2012, **12**:185
<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/185>



METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

Leptospira spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST)

Anna Rettinger¹, Inke Krupka¹, Karola Grünwald², Viktor Dyachenko¹, Volker Fingerle², Regina Konrad², Heribert Raschel², Ulrich Busch², Andreas Sing², Reinhard K Straubinger^{1*} and Ingrid Huber²

Abstract

Background: In this study mass spectrometry was used for evaluating extracted leptospiral protein samples and results were compared with molecular typing methods. For this, an extraction protocol for *Leptospira* spp. was independently established in two separate laboratories. Reference spectra were created with 28 leptospiral strains, including pathogenic, non-pathogenic and intermediate strains. This set of spectra was then evaluated on the basis of measurements with well-defined, cultured leptospiral strains and with 16 field isolates of veterinary or human origin. To verify discriminating peaks for the applied pathogenic strains, statistical analysis of the protein spectra was performed using the software tool ClinProTools. In addition, a dendrogram of the reference spectra was compared with phylogenetic trees of the 16S rRNA gene sequences and multi locus sequence typing (MLST) analysis.

Results: Defined and reproducible protein spectra using MALDI-TOF MS were obtained for all leptospiral strains. Evaluation of the newly-built reference spectra database allowed reproducible identification at the species level for the defined leptospiral strains and the field isolates. Statistical analysis of three pathogenic genomospecies revealed peak differences at the species level and for certain serovars analyzed in this study. Specific peak patterns were reproducibly detected for the serovars Tarassovi, Saxkoebing, Pomona, Copenhageni, Australis, Icterohaemorrhagiae and Grippotyphosa. Analysis of the dendrograms of the MLST data, the 16S rRNA sequencing, and the MALDI-TOF MS reference spectra showed comparable clustering.

Conclusions: MALDI-TOF MS analysis is a fast and reliable method for species identification, although *Leptospira* organisms need to be produced in a time-consuming culture process. All leptospiral strains were identified, at least at the species level, using our described extraction protocol. Statistical analysis of the three genomospecies *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* and *L. kirschneri* revealed distinctive, reproducible differentiating peaks for seven leptospiral strains which represent seven serovars. Results obtained by MALDI-TOF MS were confirmed by MLST and 16S rRNA gene sequencing.

Keywords: MALDI-TOF MS, *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira borgpetersenii*, multi locus sequence typing, LipL32, LipL41, rrs2, 16S rRNA, ClinProTools

* Correspondence: r.straubinger@lmu.de

¹Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Veterinärstr.13, 80539, Munich, Germany
Full list of author information is available at the end of the article



Background

Leptospirosis is a common mammalian zoonosis occurring worldwide. The causative agents are different serovars of pathogenic *Leptospira* strains, bacteria that belong to the order Spirochaetales. They can affect humans as well as a wide range of different mammals [1] while the clinical manifestations differ considerably [2,3]. In dogs [4-6] and humans [7,8] clinical signs vary from self-limiting flu-like symptoms to a severe illness with manifestation in specific organs, including the kidneys with acute renal failure [9], which can lead to death. In pigs [10,11] and cattle [12] still birth, abortion, and foetal birth deformities may occur. In horses *Leptospira* spp. play a role in the clinical manifestation of the Equine Recurrent Uveitis (ERU) [13].

The systematic classification of *Leptospira* spp. is complex, since the traditional classification is based on the undefined antigenic diversity between serovars [3]. This system divides the genus *Leptospira* in two groups: *Leptospira interrogans* sensu lato including all pathogenic strains and *Leptospira biflexa* sensu lato representing all non-pathogenic and saprophytic strains. Genetic classification is based on DNA hybridization and a wide range of DNA sequencing methods. Twenty genomospecies are currently described [14,15]. Since immunological and genetic typing methods target different cellular structures, these classification systems do not correspond [15]. Consequently, the characterization of *Leptospira* spp. is still challenging and time-consuming. The most commonly used diagnostic tool for clinical samples is antibody detection by the microscopic agglutination test (MAT). If serum antibodies against *Leptospira* spp. are present in a clinical sample, they will agglutinate with viable, cultured organisms of specific *Leptospira* serovars [16]. This test is highly sensitive and specific provided that the panel of bacteria used represents the specific regional epidemiological status regarding pathogenic strains. Furthermore, it is well-described that different outcomes of MAT results can occur when they are performed in different laboratories and with different MAT panels, underlining the need of internal controls [17,18].

Several molecular methods have been established to detect leptospiral DNA using specific targets to trace the agents in clinical samples such as urine. However, recently developed PCR protocols using different target genes are able to distinguish only between pathogenic and non-pathogenic leptospiral strains [19-22].

Nevertheless, in the past years it has been shown that mass spectrometry is a reliable tool for bacterial identification [23]. Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a fast and easily applied method for bacteria classification at the species level [23-25]. Mass spectrometry detects

and compares individual protein mass peaks of bacterial cells. Samples can either be spotted as native bacteria cells (direct smear), or an additional extraction step can be performed to purify the proteins of the bacteria. Most studies so far were performed with bacterial colonies grown on various solid agar-based media or MALDI-TOF MS was used to identify microorganisms directly in clinical samples such as blood or urine [26]. Only a few studies describe the mass spectrometry analysis for bacteria grown in liquid media [27,28]. This can be critical regarding the methodical MALDI-TOF MS sample preparation, and can limit the application for bacteria such as *Borrelia* or *Leptospira*, which are commonly grown in nutrient enriched semisolid or liquid media [29].

Recently, it was shown that directly spotted *Leptospira* samples can be identified at the species level using MALDI-TOF MS [27]. For some bacterial groups, it has been reported that extracted samples allow better identification than directly smeared samples [30-32]. This is due to the better quality achieved with extracted samples. In this study we, therefore, evaluated the use of MALDI-TOF MS for extracted *Leptospira* strains and compared our results with molecular typing methods. The extraction protocol established in this study for *Leptospira* spp. grown in liquid media was used to create a reference spectra database of 28 well-defined *Leptospira* strains. Based on multiple measurements, the database was evaluated with characterized leptospiral strains and with 16 field isolates. Statistical analysis with two independently compiled datasets of *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* and *L. kirschneri* was performed to visualise peak pattern differences of the protein spectra at species level and for certain serovars used in this approach. To confirm the identity for all tested strains, 16S rRNA sequencing and multi locus sequence typing (MLST) analysis was performed and compared to a created dendrogram containing all established reference spectra. In conclusion, MALDI-TOF MS is a rapid and easily applicable method for the characterisation of *Leptospira* spp. at the species level, and differentiating peaks were identified for a number of the examined strains indicating serovar affiliation. The method can be used as a comparable tool to well-established molecular genetic typing methods like MLST.

Methods

Bacterial strains and culture conditions

A panel of 28 leptospiral reference strains was used in this study, including pathogenic, non-pathogenic and intermediate strains (Table 1). The pathogenic strains represent the main causative serovars for Leptospirosis in humans and animals. The most common strains used

Table 1 *Leptospira* reference strains used for MALDI-TOF MS measurements and sequence analysis

| genomospecies | serogroup | serovar | strain | pathogenicity |
|--------------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|----------------|
| <i>L. interrogans</i> | Australis | Australis | Ballico ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. interrogans</i> | Australis | Bratislava | Jez Bratislava ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. interrogans</i> | Autumnalis | Autumnalis | Akiyami A ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. interrogans</i> | Bataviae | Bataviae | Swart ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. interrogans</i> | Canicola | Canicola | Hond Utrecht IV ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. interrogans</i> | Hebdomadis | Hebdomadis | Hebdomadis ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagiae | Copenhageni | M 20 ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | Ictero I ^b | pathogenic |
| <i>L. interrogans</i> | Pomona | Pomona | Pomona ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. interrogans</i> | Pyrogenes | Pyrogenes | Salinem ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. interrogans</i> | Sejroe | Hardjo | Hardjoprajitno ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. kirschneri</i> | Grippityphosa | Grippityphosa | Moskva V ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. borgpetersenii</i> | Sejroe | Saxkoebing | Mus 24 ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. borgpetersenii</i> | Ballum | Ballum | Mus 127 ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. borgpetersenii</i> | Sejroe | Sejroe | M 84 ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. borgpetersenii</i> | Tarassovi | Tarassovi | Perepelitsin ^{a, b} | pathogenic |
| <i>L. borgpetersenii</i> | Javanica | Javanica | Veldrat Bataviae 46 ^b | pathogenic |
| <i>L. alexanderi</i> | not defined | Manhao 3 | L60 ^c | pathogenic |
| <i>L. weilii</i> | not defined | Celledoni | Celledoni ^c | pathogenic |
| <i>L. santarosai</i> | not defined | Shermani | LT 821 ^c | pathogenic |
| <i>L. noguchii</i> | not defined | Panama | CZ 214 ^c | pathogenic |
| <i>L. broomii</i> | not defined | Not defined | 5399 ^c | intermediate |
| <i>L. fainei</i> | not defined | Hurstbridge | BUT 6 ^c | intermediate |
| <i>L. inadai</i> | not defined | Lyme | 10 ^c | intermediate |
| <i>L. biflexa</i> | Semarang | Patoc | PatocI ^c | non-pathogenic |
| <i>L. meyeri</i> | not defined | Semarang | Veldrat S173 ^c | non-pathogenic |
| <i>Turneriella parva</i> | not defined | Parva | H ^c | non-pathogenic |
| <i>Leptonema illini</i> | not defined | Illini | 3055 ^c | non-pathogenic |

^a Acquired by purchase at the Federal Institute for Risk Assessment (BfR) Head of Unit. Diagnostics, Genetics and Pathogen Characterisation, Department Biological Safety Berlin, Germany.

^b Acquired by purchase at the WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Biomedical Research, Royal Tropical Institute (KIT) Amsterdam, The Netherlands.

^c Acquired by purchase at the DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany.

in MAT panels belong to the three genomospecies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* and *L. kirschneri* (Table 1). All strains were cultured in Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris medium (Leptospira Medium Base EMJH BD, DifcoTM and Leptospira Enrichment EMJH DifcoTM, NJ, USA) at 28°C. Cultures were controlled for growth and motility by darkfield microscopy and were periodically subcultured into fresh media. Bacteria used for MALDI-TOF MS measurements and protein reference spectra generation were cultured for seven days.

Sample preparation for MALDI-TOF MS measurements

After seven days of growth and diluting the cultures with Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris medium

(EMJH media) 1:10 or 1:100 depending on the number of cells, bacteria were counted using a Petroff Hausser counting chamber (HS Hausser Scientific, Horsham, PA) by darkfield microscopy. For further preparation steps, the concentration of bacteria needed to be at least 1 x 10⁶ organisms per ml.

For ethanol/formic acid extraction, 1 ml of culture was centrifuged at 14.000 rpm at room temperature for 10 minutes. The supernatant was removed and the pellet was suspended in 300 µl distilled water. The suspension was then vortexed until the pellet was completely dissolved. Nine hundred microliters of ethanol (Roth, Rotipan[®] ≥ 99, 8% p.a., Karlsruhe, Germany) was added to inactivate the microorganisms, followed by vortexing

of the suspension. After centrifugation for 10 min at 14,000 rpm at room temperature, the pellet was visible as a grey layer on the wall of the tube. Samples were air-dried, or dried in a concentrator for 10 min at 30°C (Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) to ascertain that the ethanol could evaporate completely. The material was then dissolved in 30 µl of 70% formic acid (Merck, 98–100%, Darmstadt, Germany) followed by addition of 30 µl acetonitrile (Fluka Analytical Sigma-Aldrich, Munich, Germany). It has to be pointed out that equal volumes of 70% formic acid and acetonitrile were applied. Again, centrifugation was performed at 14,000 rpm for 2 min at room temperature. One microliter of the clear supernatant was spotted on a MSP 96 target polished steel plate (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) and allowed to dry. Following this, the dried spot was overlaid with 1 µl of matrix solution, a saturated solution of α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA, 99% Bruker Daltonik GmbH, Bremen respectively Sigma-Aldrich, Munich, Germany) composed of 50% acetonitrile (Fluka Analytical Sigma-Aldrich) and 2.5% trifluoroacetic acid (TFA Reagent Plus® 99% 100 ml, Sigma-Aldrich). Finally, samples were allowed to dry at room temperature. An optional washing step was included into the extraction protocol, to investigate if this influenced the quality of the protein spectra measurements. This step was carried out once after the first centrifugation of the cultured material with 200 µl phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged again for 10 min at 14,000 rpm at room temperature.

MALDI-TOF MS instrumental settings

Measurements were performed with two different MALDI-TOF MS instruments in two laboratories. In both cases, the Microflex LT System, MALDI Biotyper™ (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), equipped with a 60-Hz nitrogen laser was employed, using the Software for FLEX Series 1.3. Spectra were recorded in a linear positive ion detection mode in a mass range from 2,000 to 20,137 Da. Spectrometer settings were set to: Ion Source 1 (IS1) 20 kV; Ion source 2 (IS2) 16.69 kV; Lens voltage: 7 kV; Pulsed Ion Extraction: 150 ns. Each spectrum was created with the software Flex Control (Version 3.3) either in an automatic mode with variable laser power or manually with a laser power set between 29–33%. For each spectrum a total of 240 shots were summed up. Before each measurement, the instrument was calibrated using the bacterial test standard (BTS), an *Escherichia coli* DH5 α extract, spiked with two additional proteins (RNase A and myoglobin) provided by Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Germany). Preparation of the BTS and calibration were performed following the manufacturer's instructions. Calibration was successful

when proteins of the mass spectra were in a range of ± 300 ppm (parts per million).

Protein reference spectra creation and MALDI-TOF MS measurements

For the 28 leptospiral reference strains (Table 1) reference spectra, in the following called MSPs (main spectral projections), were created independently in two different laboratories. Main spectra represent individual protein spectra for one bacterial strain. To achieve representative results, at least 20 individual spectra were used to create a single MSP as proposed by Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Germany). Each sample was spotted on eight positions of the target and 24 to 30 raw spectra of the leptospiral strain and one spectrum of the bacterial test standard were measured automatically with the Flex control software. Spectra were analyzed with the Flex Analysis software (Version 3.3). The BTS was used for internal calibration. In a second step the uniformity of the created spectra sets was visually checked in a mass range of 3,000 Da to 10,000 Da. Spectra with peaks outside the allowed average were removed. Modified spectra were loaded into the MALDI BioTyper™ 3.0 Version (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Software settings for MSP creation were set to: maximal mass error of each single spectrum: 2,000; desired mass error for the MSP: 200; desired peak frequency minimum (%): 25; maximal desired peak number of the MSP: 70. Reference spectra were created automatically by the software and all created spectra were added to the main spectra library as unassigned MSPs.

The created reference spectra were evaluated based on measurements with the defined strains (see Table 1) and, additionally, with 16 field isolates (Table 2). Each strain was prepared using the ethanol/formic acid extraction and spotted on the target. Each spot was measured twice in both automatic and manual modes on different target spots.

Spectra loaded into MALDI BioTyper™ 3.0 Version were measured at the default settings. Unknown spectra were compared with the created reference library by using a score value, the common decadal logarithm for matching results.

Results were analyzed following the score value system according to Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Germany). Values from 3.00 to 2.30 indicate reliable species identification; values from 2.29 to 2.00 indicate reliable genus identification and probable species identification. Lower values stand for probable genus identification or no reliable match with the MSP database (www.bdal.de).

Statistical analysis using the ClinProTools software

MALDI-TOF MS spectra were exported into ClinProTools software version 2.2 (Bruker Daltonik GmbH,

Table 2 16 *Leptospira* field isolates identified by MALDI-TOF MS measurements and 16S rRNA sequencing

| genomospecies | serogroup | serovar | strain number | origin |
|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------|-----------------------|
| <i>L. borgpetersenii</i> | Sejroe | Saxkoebing | LGL 489 | corpus vitreum, horse |
| <i>L. interrogans</i> | Australis | Australis | LGL 537 | corpus vitreum, horse |
| <i>L. interrogans</i> | Australis | Bratislava | LGL 538 | corpus vitreum, horse |
| <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | LGL 113 | human urine |
| <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | LGL 535 | human urine |
| <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | LGL 540 | corpus vitreum, horse |
| <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | LGL 471 | human blood |
| <i>L. interrogans</i> | Canicola | Canicola | LGL 87 | human urine |
| <i>L. kirschneri</i> | Grippotyphosa | Grippotyphosa | LGL 517 | corpus vitreum, horse |
| <i>L. kirschneri</i> | Grippotyphosa | Grippotyphosa | LGL 518 | corpus vitreum, horse |
| <i>L. kirschneri</i> | Grippotyphosa | Grippotyphosa | LGL 533 | corpus vitreum, horse |
| <i>L. kirschneri</i> | Grippotyphosa | Grippotyphosa | LGL 539 | corpus vitreum, horse |
| <i>L. kirschneri</i> | Grippotyphosa | Grippotyphosa | LGL 541 | corpus vitreum, horse |
| <i>L. kirschneri</i> | Grippotyphosa | Grippotyphosa | LGL 112 | human urine |
| <i>L. kirschneri</i> | Pomona | Pomona | LGL 511 | corpus vitreum, horse |
| <i>L. kirschneri</i> | Pomona | Pomona | LGL 532 | corpus vitreum, horse |

Bremen, Germany) to carry out statistical analysis. The software was used for visual comparison of the loaded spectra, as well as for identifying specific peaks of interest. First, 20 spectra for each of the investigated strains were loaded into the program and were automatically recalibrated. To compare individual strains, the same numbers of protein spectra were required to be analyzed using ClinProTools. Classification models were automatically generated. For this, the specific algorithms of the software, including QuickClassifier (QC)/Different Average, Supervised Neural Network (SNN) and the Genetic Algorithm were used. These algorithms proposed a list of discriminating peaks for the analyzed spectra according to the selected algorithm. Suggested peaks were visually evaluated and compared with the original spectra. This procedure was done for all algorithms and a manual report was created with the most relevant and reproducible mass peaks. Furthermore, statistical testing of the datasets was performed on the basis of principle component analysis (PCA) and results were displayed in a three-dimensional score plot, which was generated automatically by the software.

Genotyping

Strain confirmation was performed by sequencing all strains on the basis of a multi locus sequence typing as described by Ahmed et al. [33]. This MLST is based on six target genes: *secY* (pre-protein translocase SecY protein), *rrs2* (16S rRNA), *adk* (adenylate kinase), *icdA* (isocitrate dehydrogenase), *LipL32* and *LipL41* (outer membrane lipoproteins). All leptospiral strains were

aligned to reference sequences for the six genes in the NCBI GenBank, if adequate sequences were available. Accession numbers for *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 are AE016823.1 and for *L. borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis strain L550: CP000348.1. Accession numbers for the *Treponema* out-group are AE017226.1, CP001843.1 and CP000805.1. For DNA extraction, each strain was cultured for seven days. Six millilitres of the cultured organisms were centrifuged at 14.000 rpm, 4°C for 10 min, the pellet was then washed once with PBS and either stored at -30°C or used directly for DNA extraction. Extraction was performed using the QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. PCR for each target gene was performed using 25 mM MgCl₂ (included in the 10x standard reaction buffer, NEB, Frankfurt am Main, Germany), 0.2 mM dNTP's (NEB), 1 U *Taq* DNA Polymerase (NEB) and 1 µl template DNA. Amplification parameters were set according to Ahmed et al. [33], using the Master Cycler® pro system (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). PCR products were visualized in 1.6% agarose gels. Products were then purified using the peqGOLD Gel Extraction Kit (Peqlab, Erlangen, Germany) following the manufacturer's instruction. Five nanograms per µl of the purified product were sequenced by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). All strains were sequenced twice. Sequence analysis was performed by using the MEGA4 Software and Neighbor Joining trees were constructed for each gene and for each leptospiral strain according to Ahmed et al. [33].

16S rRNA gene sequencing

16S rRNA gene sequencing was performed with the bacterial universal primers 27f (agagtttgatcmtggctcag) and 1392r (acgggacgggtgtgtgtrc) (see GATC Biotech AG, Konstanz, Germany; www.gatc-biotech.com, free universal primers). PCR was performed using HotStarTaq[®] Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) with the following profile: 15 min at 95°C for initial denaturation, 35 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 56°C and 1.5 min at 72°C, followed by a final extension step of 72°C for 5 min. PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequence analyses were performed using the Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) following the manufacturer's instructions. Sequencing was carried out on Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) and the sequences were analyzed using the 16S rRNA gene database of SmartGene (Lausanne, Switzerland). A Maximum Likelihood phylogenetic tree of all 28 leptospiral 16S rRNA gene sequences was computed with PHYLIP dnaml (SmartGene). The EMBL accession numbers for the 28 leptospiral 16S rRNA gene sequences were as follows: JQ988836, JQ988837, JQ988838, JQ988839, JQ988840, JQ988841, JQ988842, JQ988843, JQ988844, JQ988845, JQ988846, JQ988847, JQ988848, JQ988849, JQ988850, JQ988851, JQ988852, JQ988853, JQ988854, JQ988855, JQ988856, JQ988857, JQ988858, JQ988859, JQ988860, JQ988861, JQ988862, JQ988863. The accession number for *Treponema pallidum* was AE000520.

Results

Sample extraction procedure and MALDI-TOF MS measurements

This study focused mainly on well-defined pathogenic leptospiral strains used for serodiagnostic purposes which belong to three genomospecies: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* and *L. kirschneri*. To complete the strain collection, analyses were also performed with intermediate and non-pathogenic strains (see Table 1).

To assess the influence of the optional washing step in the sample preparation procedure for MALDI-TOF MS typing, regarding the quality of the protein spectra, we compared strains that were prepared with and without the optional additional washing step combined with the concentrator process. No differences were found in the created protein spectra when the concentrator was used to evaporate the ethanol. However, the use of the concentrator shortened the vaporizing step to 10 minutes. When the PBS washing step was omitted, peaks representing protein sizes larger than 11,000 Da were removed (data not shown). No differences were seen for reference spectra that were created on two different MALDI-TOF MS instruments (data not shown). To

evaluate if the number of passages showed any influence on the quality of the protein spectra, measurements of all reference strains were applied, with cultures that were cultivated up to thirteen passages. The number of passages did not show any influence on the quality of the protein spectra (data not shown).

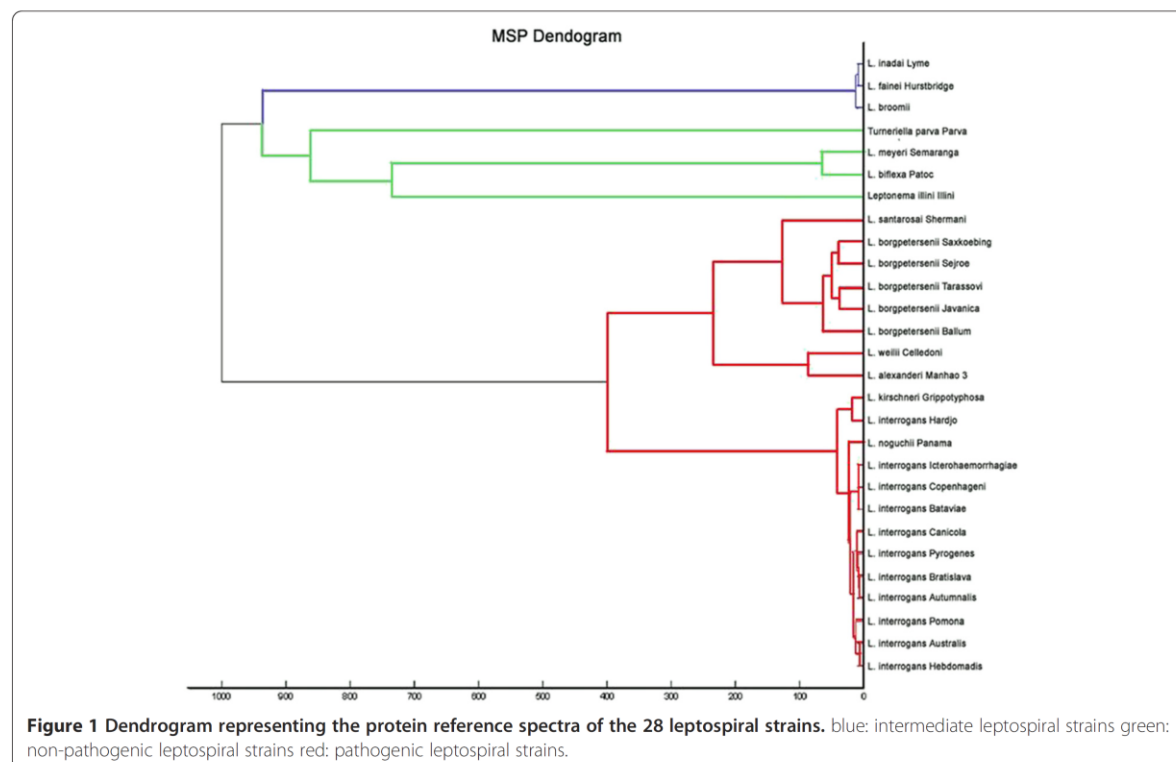
Reference spectra database creation for MALDI-TOF MS

Since the commercially available MALDI Biotyper[™] database lacks leptospiral protein profiles, reference spectra were created for all 28 leptospiral strains listed in Table 1. The established database was implemented in the reference spectra library as unassigned MSPs. Using the software MALDI Biotyper[™] all 28 leptospiral protein reference spectra were visualized in a dendrogram (Figure 1). Each of the 28 strains yielded a species-specific protein profile and was clustered according to its pathogenicity in the MALDI-TOF MS dendrogram. The strains of the pathogenic *Leptospira* species (red color) could clearly be differentiated from the non-pathogenic *Leptospira* species (green color) as well as from the intermediate species (blue color). Within the pathogenic species *L. borgpetersenii* and *L. interrogans* were located in separate clusters. Discrimination was difficult for the species *L. interrogans* and *L. kirschneri* (see Figure 1).

Protein spectra database evaluation

To test whether the established reference spectra can be used for *Leptospira* species identification, analyses were first performed with the well-defined leptospiral strains from Table 1. Measurements were repeated at least four times for each leptospiral strain to achieve reproducible results. All samples, including the non-pathogenic and intermediate strains, were correctly assigned at the species level. All reference strains of *L. interrogans* and the closely related strain of *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa matched with the correct genomospecies at first place.

In addition, 16 leptospiral field isolates (Table 2) were identified with the MALDI-TOF MS (Table 3). Field isolates belonging to one single *L. borgpetersenii* serovar and the seven *L. interrogans* strains matched with the correct genomospecies. Seven field isolates of the genomospecies *L. kirschneri* were also grouped within the correct species. One *L. kirschneri* isolate (LGL strain number 518) matched with the same score value of 2.18 in two different measurements with *L. kirschneri* and *L. interrogans* (marked with ^a in Table 3). 16S rRNA sequencing of all field isolates confirmed the MALDI-TOF results with a clear species identification of LGL strain 518 as *L. kirschneri*. Applying MALDI Biotyper[™] identification it was not possible to differentiate the leptospiral strains below the species level.



Detection of differentiating peaks within the pathogenic genomospecies

This analysis was performed to attempt the identification of discriminating peaks for serovars used in this study. For this, both datasets of the two institutions were analyzed by using the statistical software ClinProTools (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Datasets of the genomospecies *L. interrogans*, *L. kirschneri* and *L. borgpetersenii* were screened for analogies and differences in their protein profile peak patterns in order to identify specific peaks that would allow the discrimination of the analyzed serovars. As *L. interrogans* and *L. kirschneri* showed a very close relationship at the species level, these two genomospecies were analyzed independently from the species *L. borgpetersenii*.

The individual strains were analyzed applying different algorithms of the software. For this, the software selects peak combinations, which are most relevant for the separation of the analyzed dataset. Within the species *L. interrogans* individual protein peak sets were present for the serovar Pomona (3,206 Da, 3,220 Da and 3,234 Da) and the serovar Copenhageni (3,636 and 3,657 Da), resulting in visually unique peak patterns. In addition, individual peak patterns were present for the serovars Australis, and Icterohaemorrhagiae. Beyond that, it was possible to discriminate *L. kirschneri* serovar

Grippotyphosa from *L. interrogans* strains with an individual protein peak at 8,097 Da (see Table 4). To ascertain whether strains within the *L. kirschneri* species display different peak patterns, the protein spectra (MSP) of one field isolate of the serovar Pomona (LGL 511, see Table 2) was added to the dataset. Comparison of the two *L. kirschneri* serovars showed a mass deviation from 8,097 Da to 8,081 Da for the *L. kirschneri* Pomona field isolate (data not shown). Discriminating peaks occurred also within the species *L. borgpetersenii* (Table 5). The serovars Saxkoebing and Tarassovi were separated by individual protein peaks at 7,547 Da and 5,765 Da and showed a unique protein pattern each (see Table 5).

The additional statistical tool Principal component analysis (PCA) included in ClinProTools was applied to the analyzed datasets to visualize the homogeneity and heterogeneity of the protein spectra. PCA reduces the variables of a complex dataset on the basis of different statistical tests. The reduced datasets, the so-called PCs (principle components) can be displayed in a score plot illustration. Twenty individual protein spectra of the *L. interrogans* strains and the *L. kirschneri* strain are displayed in three-dimensional PCA in Figure 2. Each dot stands for a displayed protein spectrum. The colors indicate the calculated cluster membership in which each dot represents one measured protein spectrum profile

Table 3 Identification results of the 16 leptospiral field isolates by MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequencing

| field isolate (LGL strain number) | MALDI-TOF MS | | gene sequencing (16S rRNA) |
|---|---|-------------|----------------------------|
| | first match | score value | |
| <i>L. interrogans</i> Canicola (87) | <i>L. interrogans</i> Hebdomadis | 2.62 | <i>L. interrogans</i> |
| <i>L. interrogans</i> Bratislava (538) | <i>L. interrogans</i> Bratislava | 2.37 | <i>L. interrogans</i> |
| <i>L. interrogans</i> Bratislava (540) | <i>L. interrogans</i> Autumnalis | 2.46 | <i>L. interrogans</i> |
| <i>L. interrogans</i> Australis (537) | <i>L. interrogans</i> Hardjo | 2.54 | <i>L. interrogans</i> |
| <i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae (113) | <i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae | 2.67 | <i>L. interrogans</i> |
| <i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae (471) | <i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae | 2.54 | <i>L. interrogans</i> |
| <i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae (535) | <i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae | 5.57 | <i>L. interrogans</i> |
| <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa ^a (518) | <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa | 2.18 | <i>L. kirschneri</i> |
| <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa ^a (518) | <i>L. interrogans</i> Canicola | 2.18 | <i>L. kirschneri</i> |
| <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa (517) | <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa | 2.38 | <i>L. kirschneri</i> |
| <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa (533) | <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa | 2.09 | <i>L. kirschneri</i> |
| <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa (541) | <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa | 2.13 | <i>L. kirschneri</i> |
| <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa (112) | <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa | 2.54 | <i>L. kirschneri</i> |
| <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa (539) | <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa | 2.17 | <i>L. kirschneri</i> |
| <i>L. kirschneri</i> Pomona (532) | <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa | 2.28 | <i>L. kirschneri</i> |
| <i>L. kirschneri</i> Pomona (511) | <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa | 2.34 | <i>L. kirschneri</i> |
| <i>L. borgpetersenii</i> Saxkoebing (489) | <i>L. borgpetersenii</i> Saxkoebing | 2.49 | <i>L. borgpetersenii</i> |

The table pictures the most reliable identification of the field isolates with the established MSP database and lists the achieved score values.

^a *L. kirschneri* isolate that matched with the reference strain of *L. interrogans* as well as with *L. kirschneri* at first place.

for each sample. A clear separation of the serovars Pomona and Copenhageni is apparent. Conversely, *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa did not cluster separately in PCA analysis, even if specific peaks could be

detected for *L. kirschneri* in the peak statistics (see Table 4). For the genomospecies *L. borgpetersenii* the separation of the serovars Saxkoebing, Sejroe and Tarassovi was apparent when PCA was performed (Figure 3).

Table 4 Differentiating peaks based on the statistical analysis of ClinProTools within the species *L. interrogans* and *L. kirschneri*

| genomospecies | peak mass (m/z) representing the protein size in Dalton | | | | | | | | | |
|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 3,206 | 3,220 | 3,234 | 3,636 | 3,657 | 5,526 | 6,191 | 6,327 | 7,358 | 8,097 |
| <i>L. interrogans</i> Hebdomadis | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - |
| <i>L. interrogans</i> Australis | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - |
| <i>L. interrogans</i> Autumnalis | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - |
| <i>L. interrogans</i> Bratislava | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - |
| <i>L. interrogans</i> Canicola | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - |
| <i>L. interrogans</i> Copenhageni | - | - | - | ++ | ++ | + | + | + | - | - |
| <i>L. interrogans</i> Hardjo | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - |
| <i>L. interrogans</i> Pomona | ++ | ++ | ++ | - | - | + | + | + | - | - |
| <i>L. interrogans</i> Pyrogenes | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - |
| <i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - |
| <i>L. interrogans</i> Bataviae | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - |
| <i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + |

The displayed peaks are based on visual comparison of the algorithms analysis results of the software. All strains were screened twice using the QuickClassifier (QC)/Different average and SNN algorithms.

The used symbols stand for:

no peak found: -

peak present: +

peak set with high intensity: ++

Table 5 Differentiating peaks based on the statistical analysis of ClinProTools within the species *L. borgpetersenii*

| genomospecies | peak mass (m/z) representing the protein size in Dalton | | | | | |
|-------------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 3,759 | 5,765 | 5,779 | 6,388 | 7,519 | 7,547 |
| <i>L. borgpetersenii</i> Ballum | + | - | + | - | + | - |
| <i>L. borgpetersenii</i> Javanica | + | - | + | - | + | - |
| <i>L. borgpetersenii</i> Sejroe | + | - | + | - | + | - |
| <i>L. borgpetersenii</i> Saxkoebing | - | - | + | + | - | + |
| <i>L. borgpetersenii</i> Tarassovi | + | + | - | + | + | - |

The displayed peaks are based on visual comparison of the algorithm analysis results of the software. All strains were screened twice using the QuickClassifier (QC)/Different average and SNN algorithms.

The used symbols stand for:

no peak found: -

peak present: +

Strain confirmation and molecular sequencing

Sequence analysis of the 28 leptospiral reference strains was performed on the basis of MLST analysis (Figure 4) and 16S rRNA gene sequencing (Figure 5). Confirmation of the field isolates relied on 16S rRNA gene sequencing. Species identity of all used strains was confirmed. Furthermore, the constructed phylogenetic trees (Figures 4 and 5) revealed comparable clustering of the leptospiral strains. In general, intermediate (blue color), pathogenic (red color) and non-pathogenic (green color) strains

were clearly separated into different clusters. In addition, pathogenic strains of *L. borgpetersenii* and *L. interrogans* were divided into separate groups. Based on the sequence results, *L. kirschneri* was not separated from *L. interrogans* (see Figures 4 and 5). Remarkably, saprophytic strains and intermediate strains allocated to *L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai* (genes *icdA*, *secY*, *adk*, *LipL32*, *LipL41*) and *L. alexanderi* and *L. weilii* (genes *LipL32* and *LipL41*) did not produce PCR products for the MSLT data analysis of the genes indicated. Clustering

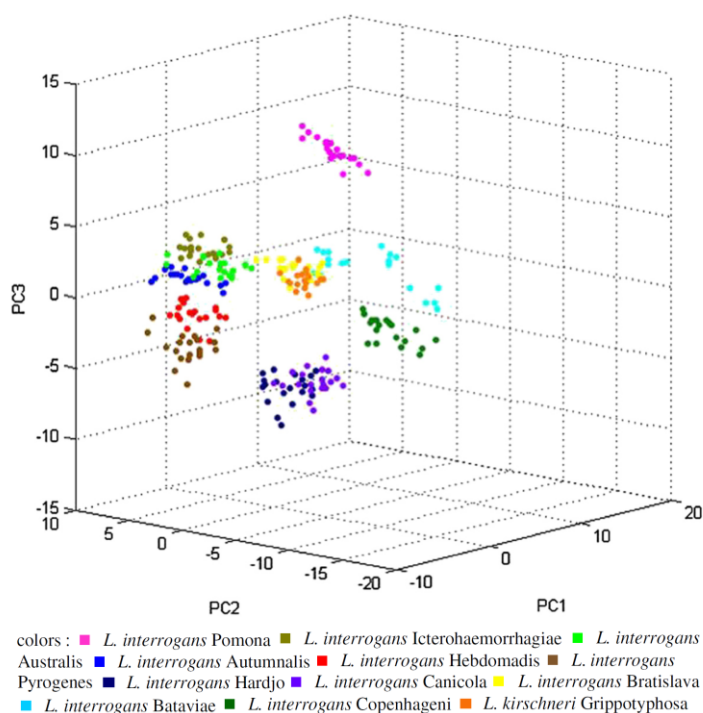


Figure 2 Principle Component Analysis (PCA) of the analyzed strains of the genomospecies *L. interrogans* and *L. kirschneri* using the software tool ClinProTools.

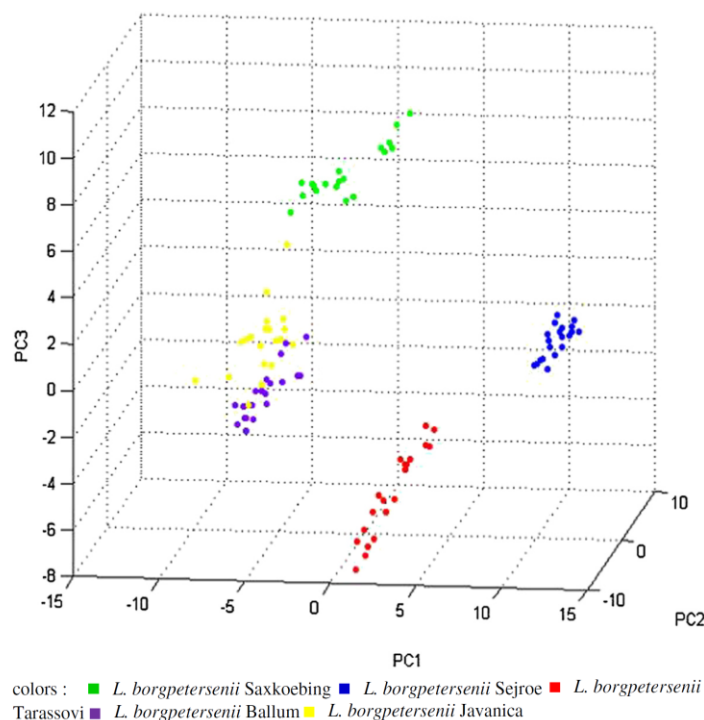


Figure 3 Principle Component Analysis (PCA) of the analyzed strains of the genomospecies. *L. borgpetersenii* using the software tool ClinProTools.

of the MSP Dendrogram (Figure 1) corresponded with the constructed phylogenetic trees (Figures 4 and 5) and confirmed the comparability of mass spectrometry and molecular typing methods.

Discussion

Recently, it was shown that the optimization and rigorous control of sample preparation are the most critical parameters for successful typing of bacterial strains, using MALDI-TOF MS [34]. To establish a robust extraction procedure for *Leptospira* spp., we optimized the commonly used ethanol/formic acid extraction protocol from Bruker Daltonik GmbH by introducing minor modifications. In this context, Djelouadji et al. demonstrated [27] that reliable leptospiral species identification is possible with directly spotted samples when organisms are available in sufficient numbers (e.g. $> 1 \times 10^5$ per ml). In our hands, leptospiral cultures needed to reach a minimal concentration of 1×10^6 organisms per ml for a successful extraction procedure. Below this concentration, no visible pellet was found after centrifugation and, following that, results of the extraction procedure were

inadequate. As described by Freiwald and Sauer [35], higher densities of bacterial organisms are needed for successful extraction procedure. This might be critical in applying the described procedure in routine diagnostics, since the isolation of *Leptospira* spp. from clinical samples, such as urine or blood, is difficult and time-consuming. It should be emphasized that positive results in laboratory cultivation may take up to six months [3]. However, it was reported that microorganisms in urine (*Escherichia coli*) [36] and in blood samples [37] were identified directly with MALDI-TOF MS.

The inclusion of the optional PBS washing step into the extraction procedure resulted in the lack of protein peaks in the mass range beyond 11,000 Da. Even if this finding did not influence the correct species identification, it can be critical when protein peaks with masses above 11,000 Da are essential for the separation of leptospiral strains. As mentioned above, this emphasizes the need for a standardized preparation procedure to exclude any influence of the sample preparation procedure on the quality of the protein spectra. Other studies also showed that bacterial protein profiles may be altered by varying

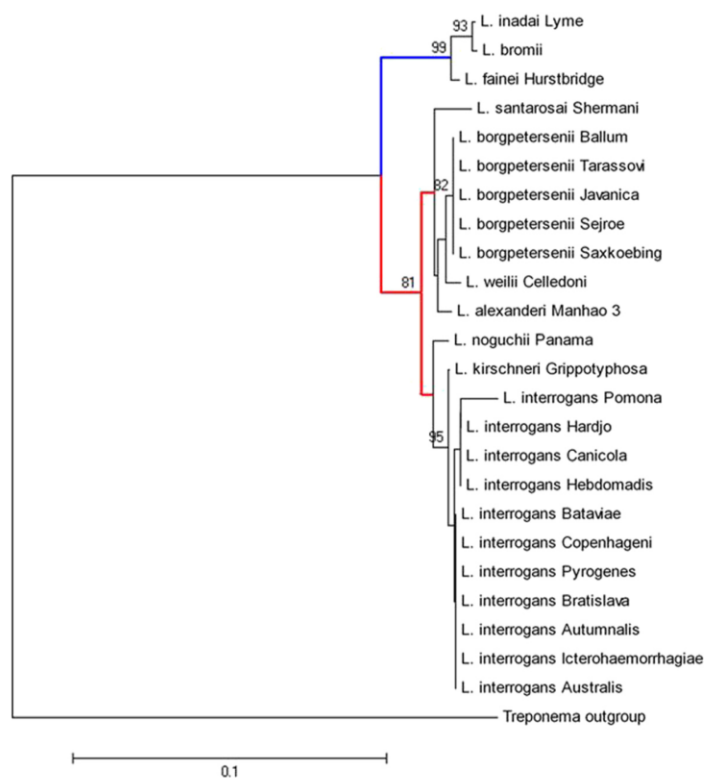


Figure 4 Neighbor Joining tree based on multi locus sequence typing analysis. The bar indicates 0.1 estimated substitution per sequence position. blue: intermediate leptospiral strains, red: pathogenic leptospiral strains.

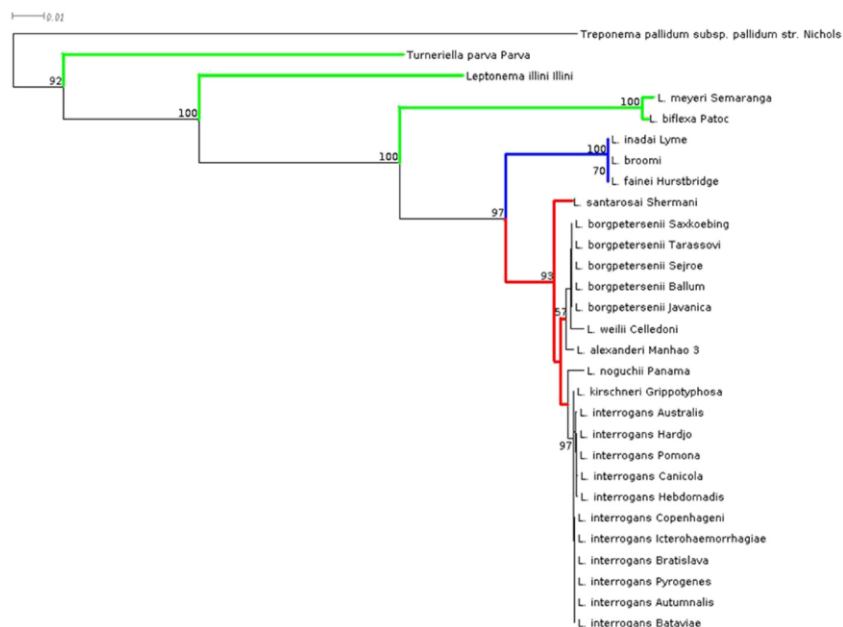


Figure 5 Maximum Likelihood phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequencing. The bar indicates 0.01 estimated substitution per sequence position. blue: intermediate leptospiral strains, green: non-pathogenic leptospiral strains, red: pathogenic leptospiral strains.

growing conditions and extraction solvents. For example, trifluoroacetic acid can be used instead of formic acid or different matrix solutions can be applied [23,38,39]. To overcome this problem, all leptospiral samples included in this study were cultured and extracted under standardized conditions. Furthermore, as proposed by Welker et al. [40] to ensure the quality of an established protein reference spectra database, each genomospecies was represented by several strains. Beyond this, MSP creation was performed twice, in two self-contained laboratories. The quality of the established database was confirmed by defined measurements. To exclude any influence of the preparation method sample protein extracts of the reference strains were spotted and measured four times in each laboratory. Reliable species identification for all used strains was successful. Only one field isolate, *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa, did match with the same score value for *L. kirschneri* and *L. interrogans*. This indicates that the differentiation of closely related species by MALDI Biotyper™ is difficult. In this case, 16S rRNA sequencing revealed the correct species to be *L. kirschneri*. The close phylogenetic relationship of the two species was confirmed in former sequencing projects [41-43]. Nevertheless, a clear separation of the species *L. borgpetersenii* and *L. interrogans* was possible. Studies showed that the genome of the two species *L. interrogans* and *L. borgpetersenii* differ in their chromosome size and gene numbers. In comparison to the other two pathogenic species, *L. borgpetersenii* contains the smallest genome size with 3,931 kb. This pathogenic species is not adapted for the existence in the outer environment [1,44], which may be due to the loss of genes in the evolutionary process. Differences in the bacterial genome structure followed by the transcription of different proteins in the host and under laboratory conditions can result in the loss of protein peaks in MALDI-TOF MS spectra leading to differences in the proteome profiles. This observation is well-described for other microorganisms such as *Brucella* spp. [37,45]. Considering these known leptospiral genomic variations, we hypothesize that it is possible to distinguish leptospiral strains on the basis of discriminating peaks in their protein profiles. The most critical point for successful subtyping of gram-positive and gram-negative bacteria is the rigorous control of the extraction procedure, as described for *Salmonella enterica* [46]. For this purpose all leptospiral strains were processed under defined working conditions. The statistical analysis software package ClinProTools was applied in this study. Reproducibility of the data was assured by applying two independently generated datasets of the same strains to ClinProTools analysis. The software automatically processes, recalibrates and compares the loaded spectra using an internal algorithm [47]. The processed peaks are then sorted according to their

statistical separation strength [48]. Using this method, we were able to detect differentiating peaks for the serovars used in this study namely *L. interrogans* serovar Pomona and Copenhageni, *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa and *L. borgpetersenii* serovar Saxkoebing and Tarassovi (Table 4 and Table 5). Minor discrepancies in the protein profiles were present for the serovars Australis and Icterohaemorrhagiae. Based on the statistical method PCA, one additional leptospiral strain, *L. borgpetersenii* serovar Sejroe, formed a distant cluster with regard to the other strains (Figure 3). A *L. borgpetersenii* serovar Sejroe specific peak at 6,003 Da was also detected by applying ClinProTools analysis in one of the two datasets. Since it could not be verified by the second dataset, it has not been further considered for identification. No differentiation was observed for the genomospecies *L. kirschneri*. Our findings lead to the conclusion that it is possible to discriminate our applied leptospiral strains on the basis of differences in their protein peak patterns, but we cannot claim this for other serovars or strains. Strain-specific differentiation using MALDI-TOF MS analysis has previously been shown by different studies [49-51] and discrimination of different serovars of *Salmonella enterica* has been postulated before [46,52]. This supports the hypothesis that MALDI-TOF MS is an important and useful technology for the identification and subtyping of bacterial isolates. Serovars of leptospiral strains are determined by antigenic variations in the LPS [15]. MALDI-TOF MS, however, mainly detects ribosomal proteins [45]. Consequently, we cannot claim conclusively that we identified universal serovar-specific peaks since we used a selected panel of serovars in this study. We suppose that the observed peak differences for some strains indicate serovar affiliation. To confirm this finding a larger panel of strains and serovars needs to be tested.

The results of gene sequencing confirmed the MALDI-TOF MS-based species identification of all *Leptospiral* strains. The dendrogram of the reference spectra matched the phylogenetic trees constructed, using 16S rRNA sequences and MLST data (Figures 4 and 5). Minimal discrepancies that occurred within single clades can be explained on the basis of the used target genes, since MALDI-TOF MS mainly detects ribosomal proteins [45]. That is why MSPs dendrograms are closely comparable to phylogenetic trees based on 16S rRNA sequencing [23,26,35]. From the six genes used for the MLST, only the *rrs2* gene encodes for the 16S rRNA. The lack of amplicons for some target genes is most likely due to the absence of certain genes in some leptospiral strains. Non-pathogenic *leptospiral* strains do not carry genes that encode the outer membrane lipoproteins *LipL32* and *LipL41* [53]. Similarly, it has been reported that PCR fragments were not producible for intermediate

and non-pathogenic strains when they were tested for the *secY*, *adk* and *icdA* genes [43,54]. An additional problem is the quality of the PCR method, since many of them do not amplify genes, even though they are present in the organism. The PCR settings must be optimized for intermediate and non-pathogenic strains [55] and, in a recent study, primers were optimized for all genes to provide greater power for discrimination of *Leptospira* strains [54].

Our method showed that MALDI-TOF MS can be a useful tool to identify cultured leptospiral strains at the species level. This would be of interest to diagnostic laboratories, because internal controls for leptospiral cultures such as for MAT panels are indispensable. Species confirmation by MALDI-TOF MS is faster and more easily applied as compared with other, more elaborate, molecular typing methods which may be complemented by MALDI-TOF MS techniques.

Conclusions

The protein spectra database established in this study was built on a wide variety of well-defined leptospiral strains that represent the major causative agents of leptospirosis in humans and animals, as well as intermediate and non-pathogenic strains. With our established extraction protocol, we were able to reproducibly detect *Leptospira* species from defined samples as well as from field isolates. Analysis with the software ClinProTools suggested discriminating peaks within the pathogenic species *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* and *L. kirschneri*, indicating that it is possible to discriminate certain serovars that belong to the same genomospecies using MALDI-TOF MS. Results of the mass spectrometry analysis and the molecular sequence methods correlated well with each other and confirmed the reliability of MALDI-TOF MS in detecting *Leptospira* species.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AR executed the MALDI-TOF MS and MLST experiments, analyzed the data and drafted the manuscript; AS initiated the LGL study, participated in the study design at the LGL and critically revised the manuscript; HR provided the field-collected strains and critically revised the manuscript; IH participated in the design of the study, coordinated the experiments at the LGL, participated in the analysis of the data and drafted the manuscript; IK participated in the design of the study, coordinated the experiments at the LMU, participated in the data analysis and critically revised the manuscript; KG processed the MALDI-TOF MS and ClinProTools experiments, performed the 16S rRNA sequencing and analyzed the data; RK participated in the design of the study as well as in the analysis of the data; RKS coordinated and supervised the study at the LMU Microbiology Department and critically revised the manuscript; UB participated in the study design at the LGL and critically revised the manuscript; VD participated in the MALDI-TOF MS study design at the LMU and critically revised the manuscript; VF initiated the LGL study part, participated in the design of the study at LGL and critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to Rudy A. Hartskeerl and Ahmed Ahmed from the WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Biomedical Research, Royal Tropical Institute (KIT) Amsterdam, The Netherlands for helpful scientific advice and sequencing the *secY*-locus in test samples. We thank Peter Kopp and Ivonne Stamm from IDEXX Vetmed Labor, Ludwigsburg, Germany as well as Enno Luge from the Federal Institute of Risk assessment, BfR Berlin, Germany for technical and scientific advice. We also thank Maria Hauser at the Bavarian Health and Food Safety Authority for growing the cultures and providing us with *Leptospira* strains. We are grateful to Dr. Markus Timke at Bruker Daltonik GmbH for his support. For the construction of the Maximum Likelihood phylogenetic tree of the 16S rRNA sequences the authors greatly thank Mr. Thierry Lombardot of Smartgene services (Lausanne, Switzerland). We thank Leland Carmichael and Robert O. Gilbert for the critical revision of the manuscript.

Author details

¹Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Veterinaerstr.13, 80539, Munich, Germany. ²Bavarian Health and Food Safety Authority, Veterinaerstr. 2, D-85764, Oberschleißheim, Germany.

Received: 10 May 2012 Accepted: 30 July 2012

Published: 27 August 2012

References

- Adler B, de la Pena MA: *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010, **140**:287–296.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al: *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis* 2003, **3**:757–771.
- Levett PN: *Leptospirosis. Clin Microbiol Rev* 2001, **14**:296–326.
- Andre-Fontaine G: *Canine leptospirosis—do we have a problem? Vet Microbiol* 2006, **117**:19–24.
- Geisen V, Stengel C, Brem S, Muller W, Greene C, Hartmann K: *Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected Leptospira serogroups (42 cases). J Small Anim Pract* 2007, **48**:324–328.
- Goldstein RE: *Canine leptospirosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010, **40**:1091–1101.
- Adler B, Braggar JM: *Leptospiral infections in humans. Med J Aust* 1976, **2**:357.
- Yang CW, Wu MS, Pan MJ: *Leptospirosis renal disease. Nephrol Dial Transplant* 2001, **16**(Suppl 5):73–77.
- Visith S, Kearkiat P: *Nephropathy in leptospirosis. J Postgrad Med* 2005, **51**:184–188.
- Bolin CA, Cassells JA, Hill HT, Frantz JC, Nielsen JN: *Reproductive failure associated with Leptospira interrogans serovar bratislava infection of swine. J Vet Diagn Invest* 1991, **3**:152–154.
- Ellis WA: *Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1994, **10**:463–478.
- Kingscote BF: *Diagnosis of Leptospira serovar hardjo Infection in Cattle in Canada. Can Vet J* 1985, **26**:270–274.
- Curling A: *Equine recurrent uveitis: classification, etiology, and pathogenesis. Compend Contin Educ Vet* 2011, **33**:E1–E4.
- Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS: *Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for Leptospira alexanderi sp. nov. and four new Leptospira genomospecies. Int J Syst Bacteriol* 1999, **49**(Pt 2):839–858.
- Cerqueira GM, Picardeau M: *A century of Leptospira strain typing. Infect Genet Evol* 2009, **9**:760–768.
- Toyokawa T, Ohnishi M, Koizumi N: *Diagnosis of acute leptospirosis. Expert Rev Anti Infect Ther* 2011, **9**:111–121.
- Cerqueira GM, McBride AJ, Queiroz A, Pinto LS, Silva EF, Hartskeerl RA, et al: *Monitoring Leptospira strain collections: the need for quality control. AmJ Trop Med Hyg* 2010, **82**:83–87.
- Miller MD, Annis KM, Lappin MR, Lunn KF: *Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. J Vet Intern Med* 2011, **25**:426–432.

19. da SJ B, Carvalho E, Hartskeerl RA, Ho PL: Evaluation of the Use of Selective PCR Amplification of LPS Biosynthesis Genes for Molecular Typing of *Leptospira* at the Serovar Level. *Curr Microbiol* 2010, **62**:518–524.
20. Branger C, Blanchard B, Fillonneau C, Suard I, Aviat F, Chevallier B, et al: Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol Lett* 2005, **243**:437–445.
21. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW: Detection of pathogenic *leptospires* by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 2005, **54**:45–49.
22. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD: Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol* 2006, **6**:95.
23. Sauer S, Kliem M: Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2010, **8**:74–82.
24. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB: The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 1996, **14**:1584–1586.
25. Stephan R, Ziegler D, Pfluger V, Vogel G, Lehner A: Rapid genus- and species-specific identification of *Cronobacter* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010, **48**:2846–2851.
26. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S: MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 2011, **93**:965–974.
27. Djelouadi Z, Roux V, Raoult D, Kodjo A, Drancourt M: Rapid MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Leptospira* organisms. *Vet Microbiol* 2012, **158**:142–146.
28. Zhou N, Wang N, Xu B, Wang J, Fang J, Dong F, et al: Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of bacteria cultured in liquid media. *Sci China Life Sci* 2011, **54**:48–53.
29. Czekalowski JW, Mcleod JW, Rodican J: Observations on the nutrition of *Leptospira* based on the development of Dinger's phenomenon. *J Gen Microbiol* 1954, **10**:199–208.
30. Alatoom AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R: Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011, **49**:2868–2873.
31. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al: Comparison of two matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol* 2010, **48**:1169–1175.
32. Smole SC, King LA, Leopold PE, Arbeit RD: Sample preparation of Gram-positive bacteria for identification by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight. *J Microbiol Methods* 2002, **48**:107–115.
33. Ahmed N, Devi SM, Valverde ML, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, et al: Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006, **5**:28.
34. Murray PR: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2010, **16**:1626–1630.
35. Freiwald A, Sauer S: Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat Protoc* 2009, **4**:732–742.
36. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, et al: Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010, **48**:2110–2115.
37. Ferreira L, Vega CS, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Cabrero S, Menegotto F, Orduna-Domingo A, et al: Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. *PLoS One* 2010, **5**:e14235.
38. Carboneille E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, et al: MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem* 2011, **44**:104–109.
39. Saenz AJ, Petersen CE, Valentine NB, Gantt SL, Jarman KH, Kingsley MT, et al: Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999, **13**:1580–1585.
40. Welker M: Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics* 2011, **11**:3143–3153.
41. Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL: Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol* 2004, **186**:2818–2828.
42. Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW, Levett PN: Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16 S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 2006, **44**:3510–3516.
43. Victoria B, Ahmed A, Zuerner RL, Ahmed N, Bulach DM, Quinteiro J, et al: Conservation of the S10-spc-alpha locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. *PLoS One* 2008, **3**:e2752.
44. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL: Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet Microbiol* 2011, **153**:73–81.
45. Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, et al: Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One* 2008, **3**:e2843.
46. Diekmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B: Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:7767–7778.
47. Zhang X, Leung SM, Morris CR, Shigenaga MK: Evaluation of a novel, integrated approach using functionalized magnetic beads, bench-top MALDI-TOF-MS with prestructured sample supports, and pattern recognition software for profiling potential biomarkers in human plasma. *J Biomol Tech* 2004, **15**:167–175.
48. Ketterlinus R, Hsieh SY, Teng SH, Lee H, Pusch W: Fishing for biomarkers: analyzing mass spectrometry data with the new ClinProTools software. *Biotechniques* 2005, **38**:37–40.
49. Friedrichs C, Rodloff AC, Chhatwal GS, Schellenberger W, Eschrich K: Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J Clin Microbiol* 2007, **45**:2392–2397.
50. Jackson KA, Edwards-Jones V, Sutton CW, Fox AJ: Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods* 2005, **62**:273–284.
51. Tanigawa K, Kawabata H, Watanabe K: Identification and typing of *Lactococcus lactis* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:4055–4062.
52. Leuschner RG, Beresford-Jones N, Robinson C: Difference and consensus of whole cell *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry spectra. *Lett Appl Microbiol* 2004, **38**:24–31.
53. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, et al: Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One* 2008, **3**:e1607.
54. Ahmed A, Thaipadungpanit J, Boonsilp S, Wuthiekanun V, Nalam K, Spratt BG, et al: Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis* 2011, **5**:e1374.
55. Nalam K, Ahmed A, Devi SM, Francalacci P, Baig M, Sechi LA, et al: Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology. *PLoS One* 2010, **5**:e12637.

doi:10.1186/1471-2180-12-185

Cite this article as: Rettinger et al.: *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiology* 2012 **12**:185.

IV. DISKUSSION

Das globale Auftreten der Leptospirose stellt ein zunehmendes öffentliches Gesundheitsproblem dar (HARTSKEERL et al., 2011), denn durch die Globalisierung und vermehrten Reiseaktivitäten gewinnt diese Zoonose auch in Industrieländern wie Deutschland, Japan und den USA zunehmend an Bedeutung (JANSEN et al., 2005; KOIZUMI et al., 2009). Infektionen mit Leptospiren führen zur Ausbildung verschiedener Krankheitsbilder bei den Haussäugetieren und dem Menschen. Neben den mild verlaufenden, grippeähnlichen Symptomen bei Menschen und Hunden kommen auch letale Verlaufsformen vor (KO et al., 2009; SYKES et al., 2011). Bei Nutztieren stehen vor allem Reproduktionsstörungen und die damit verbundenen hohen wirtschaftlichen Verluste im Vordergrund (BOLIN et al., 1991; GUITIAN et al., 2001; HARTSKEERL et al., 2011). Die Ätiologie der ERU der Pferde wird mit pathogenen Leptospiren assoziiert (CURLING, 2011). Die Leptospirose ist in Deutschland meldepflichtig für Schweine, Schafe und den Menschen (STRUTZBERG-MINDER et al., 2011).

Problematisch ist die große serologische und genetische Vielfalt der zahlreichen beschriebenen Leptospirenstämme und Leptospirenserovare. Die für die taxonomische Einteilung von Leptospiren vorhandenen zwei Klassifizierungsschemata werden parallel verwendet, obwohl sie nicht miteinander vergleichbar sind (CERQUEIRA et al., 2009). Der diagnostische Nachweis basiert auf den antigenetischen Eigenschaften der verschiedenen Serovare. Daher wird nach wie vor das serologische Klassifizierungsschema in der serologischen Diagnostik verwendet. Vor allem für phylogenetische Studien von *Leptospira* spp., aber auch für die Identifizierung klinischer Isolate werden jedoch molekulare Typisierungsmethoden wie PFGE oder MLST vermehrt angewendet (NALAM et al., 2010). Die noch relativ neue Methode des MALDI-TOF MS wird in der Routinediagnostik zunehmend für die Identifizierung und die Klassifizierung von Bakterien verwendet. Die Technologie erfasst dabei, im Gegensatz zu Genom-basierten Methoden wie beispielsweise dem MLST, Unterschiede in den Proteinprofilen der Bakterienproben. Von Vorteil ist dabei die schnelle, einfache und breite Anwendbarkeit dieser Methode für verschiedene Bakterien und die gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu der taxonomischen Einteilung durch Gensequenzierungen wie der 16S rRNA (BENAGLI et al., 2011; WELKER (2), 2011).

Ziel dieser Arbeit war es daher MALDI-TOF MS für die Differenzierung von *Leptospira* spp. anzuwenden und erstmals mit bereits etablierten molekularbiologischen, auf den Genomen basierenden, Differenzierungsmethoden zu vergleichen.

1 Die Notwendigkeit eines standardisierten Extraktionsprotokolls unter Berücksichtigung der Präparationsmethode und der Kulturbedingung

MALDI-TOF MS ist eine sichere und schnelle Methode für die Differenzierung von Bakterienspezies (WIESER et al., 2011). Für den Nachweis werden die Bakterienproben in der Routinediagnostik häufig direkt auf das Target aufgetragen, ohne dass die Proteine der Probe von anderen Zellbestandteilen extrahiert werden (Abbildung 10). Dadurch kann der Erreger schnell auf Genus- oder Speziesebene bestimmt werden (BIZZINI et al., 2010; FREIWALD et al., 2009; WIESER et al., 2011). Durch die Extraktion der Proteine (Abbildung 10) können qualitativ hochwertige Spektren generiert werden und diese werden, im Vergleich zu direkt aufgetragenen Proben, mit einem besseren Ergebnis erkannt (ALATOOM et al., 2011; BIZZINI et al., 2010).

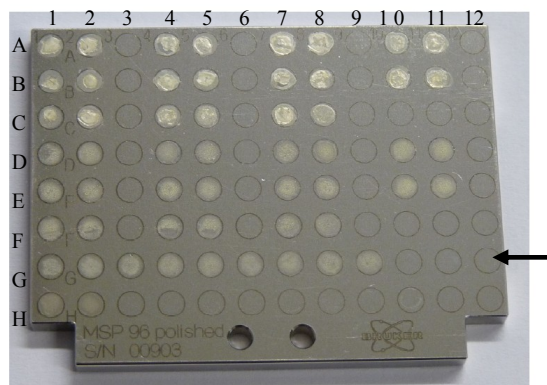


Abbildung 10: Vergleichende Darstellung von direkt aufgetragenen und extrahierten Proben von *Leptospira* spp. auf einem Target

MSP 96 polished steel target (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)

Der Pfeil deutet auf einen Spot des Target

Spot A1 bis C8: direkt aufgetragene Proben von *Leptospira* spp.

Spot D1 bis H2: mittels Ethanol-Ameisensäure extrahierte Proben von *Leptospira* spp.

Während für die reine diagnostische Identifizierung von Bakterienproben auf Genus- oder Speziesebene keine standardisierte Probenvorbereitung notwendig ist, kann dies für die Typisierung von Bakterienstämmen essentiell sein. Parameter wie die verwendete Matrix, die Matrixzusammensetzung, die Probenvorbereitung, sowie das verwendete Medium können einen Einfluss auf die Proteinprofile haben (MURRAY, 2010). Diese Tatsache bestätigte sich auch im Verlauf der hier vorgestellten Arbeit. Um eine standardisierte und reproduzierbare

Probenvorbereitung zu gewährleisten, wurde ein Extraktionsprotokoll für *Leptospira* spp. an zwei Instituten (Teilprojekt A und B der Tabelle A2, Anhang) unabhängig voneinander etabliert. Mögliche Auswirkungen des Kulturmediums, der Wachstumsphase der Kulturen, sowie die Durchführung zusätzlicher Schritte während der Extraktion auf die Generierung der Proteinspektren wurden durch Probemessungen geprüft (Teilprojekt C und D Tabelle A2, Anhang). Bei Messungen von mit Matrix überschichtetem Kultivierungsmedium ohne Leptospiren konnten keine Proteinpeaks generiert werden und daher ein Einfluss dieses komplexen Mediums auf die Proteinspektren ausgeschlossen werden. Unterschiede wurden dagegen bei der notwendigen Bakteriendichte in Abhängigkeit des Alters und Präparationsmethode der verwendeten Kultur erfasst (Teilprojekt C Tabelle A2, Anhang). Für die Erstellung von Proteinspektren war eine Bakteriendichte von mindestens 1×10^5 Leptospiren/ml für direkt aufgetragene Proben, 1×10^6 Leptospiren/ml für extrahierte Proben und 1×10^7 Leptospiren/ml für 19 Tage alte, direkt aufgetragene, Proben notwendig. Dies bestätigt veröffentlichte Daten, die zeigen, dass für extrahierte Proben eine höhere Bakteriendichte notwendig ist als für direkt aufgetragene Proben (FREIWALD et al., 2009). Als kritisch ist dagegen die hohe Anzahl an bereits lytischen Leptospirenzellen bei den analysierten 19 Tage alten Kulturen und die daraus resultierende notwendige hohe Bakteriendichte zu beurteilen, die für eine erfolgreiche Generierung von Proteinspektren notwendig war. Für Messungen mittels MALDI-TOF MS sollten sich Bakterienproben immer in der exponentiellen oder stationären Wachstumsphase befinden (FREIWALD et al., 2009). Grund dafür ist, dass die erfassten Proteine nur in der exponentiellen Wachstumsphase stabil exprimiert werden (WELKER (2), 2011). Wie in dieser Arbeit gezeigt, können neben kultivierungsbedingten Einflüssen auch Veränderungen bei der Probenvorbereitung zu Abweichungen in den detektierten Proteinmassen bei der MALDI-TOF-MS-Analyse führen. Die Durchführung eines zusätzlichen Waschschrutes im Extraktionsprozess führte zur Erstellung von Proteinspektren bei denen Proteinpeaks ab 10.000 Da nicht mehr generiert werden konnten (siehe Diskussion Publikation und Teilprojekt D Tabelle A2, Anhang). Die größten Unterschiede bei den Proteinpeaks der Vertreter einer Bakterienspezies treten primär im Massenbereich zwischen 3.000 bis 20.000 Da auf (WELKER (2), 2011). Abweichungen im Extraktionsprotokoll sind dann als kritisch zu betrachten, wenn diese zu qualitativen Veränderungen im genannten Massenbereich der Peakprofile führen, welche die Differenzierung von Bakterienstämmen innerhalb einer Spezies gefährden können. Dies betrifft vor allem die Unterscheidung phylogenetisch nah verwandter Bakterien, wie beispielsweise *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*, bei denen die Proteinprofile sehr ähnlich sind (WELKER (2), 2011). Daher kann eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nur gewährleistet werden, wenn die

Wachstums- und Präparationsbedingungen nach einem rigorosen, standardisierten Protokoll erfolgen.

2 Differenzierbarkeit von *Leptospira* spp. mittels MALDI-TOF MS und Analyse der differenzierenden Proteinpeaks

Die Qualität der Proteinprofile in der hinterlegten Datenbank bestimmt die Identifizierbarkeit der Bakterienspezies der diagnostischen Probe, deren Proteinprofil mit dieser Datenbank abgeglichen wird. Ein sicherer, speziesspezifischer Fingerabdruck kann dabei nur erstellt werden, wenn mehrere Isolate oder Stämme einer Spezies in der Datenbank vorhanden sind (LARTIGUE et al., 2009). Die in dieser Arbeit etablierte Referenzdatenbank basierte auf insgesamt 28 verschiedenen Leptospirenstämmen, wobei die drei pathogenen Genospezies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* und *L. kirschneri* durch mehrere Serovare vertreten waren (Teilprojekt A und B Tabelle A2 und Tabelle A3, Anhang). Mit allen definierten Laborstämmen sowie mit 16 Feldisolaten (Table 2, Publikation) konnte so eine sichere und reproduzierbare Differenzierung der pathogenen, apathogenen und intermediären Leptospirenstämme sowie der Genospezies erreicht werden (Teilprojekt A, B und E Tabelle A2, Anhang). Nur in einem Fall wurde bei dem Abgleich eines Feldisolates der Genospezies *L. kirschneri* die falsche Genospezies *L. interrogans* mittels MALDI-TOF MS erkannt (siehe Diskussion, Publikation). Die phylogenetische, enge Verwandtschaft dieser zwei Genospezies wurde bereits durch verschiedene Sequenzierungsprojekte belegt (AHMED et al., 2006; CERQUEIRA et al., 2009; MOREY et al., 2006). Die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Proteinprofile dieser drei Spezies lassen sich in einem Dendrogram darstellen (Abbildung 9 und Figure 1, Publikation). Dabei wurden die Referenzspektren der Serovare der Genospezies *L. borgpetersenii* separat von den Serovaren der Genospezies *L. interrogans/L. kirschneri* eingeordnet. Daher kann hier eine vergleichbare Sensitivität von MALDI-TOF MS und MLST gezeigt werden, da beide Methoden bei diesen zwei eng verwandten Genospezies an ihre analytischen Grenzen stoßen.

Das allgemeine Prinzip der Massenspektrometrie basiert auf der Erfassung genetischer Variationen bei den detektierten, als Protein exprimierten, Haushaltsgenen. Dabei ermöglichen geringe Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der untersuchten Gene, wie sie beispielsweise durch Punktmutationen entstehen können, eine Differenzierung nahe verwandter Arten (DIECKMANN et al., 2008). Auf diesem Prinzip beruht auch die Subtypisierung. Dabei geht man davon aus, dass eine Unterscheidung unterhalb der Speziesebene möglich ist, da die

Proteine, die den erfassten Haushaltsgenen zugeordnet werden, auch bei nahe verwandten Arten nicht identisch sind und so eine Differenzierung der Proteinspektren möglich ist (WELKER (2), 2011). Basierend auf dieser Annahme wurden die etablierten Referenzspektren der drei pathogenen Genospezies *L. borgpetersenii* und *L. interrogans*/*L. kirschneri* mittels der statistischen Software ClinProTools (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) analysiert, um Proteinpeaks zu identifizieren, die eine Separierung der in dieser Arbeit verwendeten Leptospirenstämme ermöglichen (Teilprojekte F und G Tabelle A2, Anhang). Diese Software verwendet zwei verschiedene statistische Analyseverfahren. Neben verschiedenen Algorithmen (Tabelle 8) können die Datensätze auch mittels der Principle Component Analyses (PCA) analysiert werden. Bei der Auswertung der Datensätze wurden reproduzierbar für insgesamt sieben der in dieser Arbeit verwendeten Serovare, basierend auf den drei unterschiedlichen Algorithmen (Tabelle 8), diskriminierende Proteinpeaks identifiziert (Tabelle 8 und Diskussion Publikation). Die Serovare Icterohaemorrhagiae und Australis sowie das Serovar Grippotyphosa der Genospezies *L. kirschneri* waren nicht mittels PCA unterscheidbar. Das Serovar Sejroe konnte dagegen nur durch das Verfahren der PCA-Analyse differenziert werden. Diese Problematik ist auch für die Differenzierung der Stämme der *Mycobacterium-avium*-Spezies beschrieben, die zwar anhand ihrer Proteinspektren separiert wurden, nicht jedoch mittels der sogenannten Clusteranalyse (HETTICK et al., 2006). Die genannten Autoren nahmen an, dass bei nur geringen Unterschieden der Proteinmassen der analysierten Spektren eine Unterscheidung mittels Clusteranalyse nicht möglich ist. Dies trifft auch auf die in dieser Arbeit untersuchten Datensätze der Leptospirenstämme der Spezies *L. interrogans* und *L. kirschneri* zu. Dabei mussten für eine erfolgreiche Separierung mittels PCA mindestens zwei differenzierende Proteinpeaks bei den Leptospirenstämmen vorhanden sein, um sie von den anderen Stämmen zu unterscheiden. Bezogen auf die in dieser Arbeit durch die Anwendung der verschiedenen Algorithmen ermittelten diskriminierenden Proteinpeaks wies das Serovar Pomona drei individuelle Proteinpeaks und das Serovar Copenhageni zwei individuelle Proteinpeaks auf (Table 4, Publikation). Der einzige differenzierende Proteinpeak für das Serovar Grippotyphosa bei 8.097 Da reichte gemäß den oben genannten Kriterien hingegen nicht aus, um dieses Serovar von den Stämmen der Genospezies *L. interrogans* zu unterscheiden. Das Proteinspektrum des ebenfalls mittels PCA nicht differenzierten Serovar Australis unterschied sich auch nur durch einen Proteinpeak. Diesem Serovar fehlte dabei, im Vergleich zu den Proteinspektren der anderen Leptospirenstämme, der Proteinpeak bei 5.526 Da.

Tabelle 8: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Serovare für die differenzierende Proteinpeaks mittels ClinProTools detektiert wurden

| Verwendete statistische Analyseverfahren der Software ClinProTools | | |
|--|---|--|
| Genospezies | Algorithmen | PCA |
| <i>L. interrogans</i> | ^a Pomona, ^a Copenhageni, ^a Icterohaemorrhagiae, ^a Australis | ^a Pomona, ^a Copenhageni |
| <i>L. kirschneri</i> | ^a Grippotyphosa | - |
| <i>L. borgpetersenii</i> | ^a Saxkoebing, ^a Tarassovi | ^a Saxkoebing, ^a Tarassovi, ^a Sejroe |

L. interrogans/*L. kirschneri* wurden getrennt von *L. borgpetersenii* analysiert

verwendete Algorithmen: QuickClassifier (QC), Supervised Neural Network (SNN) und Genetic Algorithm

- ^a Serovar, das diskriminierende Peaks innerhalb der untersuchten Genospezies aufwies
 - keine Differenzierung möglich

Zur Bestätigung der statistischen Analysen wurden alle für die Erstellung von Referenzspektren verwendeten Proteinspektren visuell auf Unterschiede in den Proteinprofilen auf Ebene der Genospezies sowie der Serovare untersucht (Teilprojekt H Tabelle A2, Anhang). Die dabei detektierten Unterschiede in den Proteinmassen konnten die Analysen mittels ClinProTools bestätigen (siehe Vergleich Tabelle 9 mit Table 4 und Table 5, Publikation).

Tabelle 9: Visuell detektierte Peak-Differenzen innerhalb der pathogenen Genospezies *L. borgpetersenii* und *L. interrogans*/*L. kirschneri*

| Serovar | Proteinmasse in Da mit einer möglichen Massenabweichung von ± 20 Da | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 3.200 | 3.710 | 5.020 | 5.200 | 5.780 | 6.380 | 6.410 | 6.520 | 6.700 | 7.480 | 7.570 |
| ^a Tarassovi | - | x | x | x | x | x | - | x | x | x | - |
| ^a Saxkoebing | x | - | - | - | - | x | - | x | - | - | x |
| ^a Ballum | - | - | - | - | - | - | x | - | - | - | - |
| ^a Sejroe | - | - | - | - | - | - | x | - | - | - | - |

| Serovar | Proteinmasse in Da mit einer möglichen Massenabweichung von ± 20 Da | | | | | | |
|----------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 3.200 | 4.800 | 5.530 | 6.325 | 7.725 | 8.100 | 8.200 |
| ^b Pomona | x | - | - | x | x | - | - |
| ^b Copenhageni | - | - | - | x | - | - | - |
| ^b Autumnalis | - | +/- | - | - | - | - | x |
| ^b Australis | - | - | x | - | - | - | - |
| ^c Grippotyphosa | - | - | - | - | - | x | - |

^a Serovare der Genospezies *L. borgpetersenii*

^b Serovare der Genospezies *L. interrogans*

^c Serovar der Genospezies *L. kirschneri*

x = Proteinpeak vorhanden; - = Kein Proteinpeak vorhanden; +/- = schwach ausgeprägter Proteinpeak (geringe Intensität)

Sowohl die visuelle Untersuchung als auch die Analyse mittels ClinProTools ermöglichte eine Differenzierung verschiedener, in dieser Arbeit verwendeter Serovare. Dabei konnten auch die beiden phylogenetisch eng verwandten Genospezies *L. interrogans* und *L. kirschneri* anhand eines Proteinpeaks bei 8.097 Da unterschieden werden (Table 4, Publikation). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für andere Bakterien beschrieben. Werno et al. konnten durch die visuelle Untersuchung der Proteinspektren diskriminierende Proteinpeaks identifizieren, die eine Separierung verschiedener Stämme von *Streptococcus pneumoniae* und der *Streptococcus-mitis*-Gruppe ermöglichten (WERNO et al., 2012). Diese beiden Gruppen konnten bisher nicht mittels MALDI-TOF MS unterschieden werden. Die Klassifizierung der Subspezies von Salmonellen, ein Bakteriengenus das wie *Leptospira* eine Vielzahl von Serovaren umfasst, gelang hingegen nur durch weiterführende statistische Analyseverfahren, die eine Detektion spezifischer Biomarker ermöglichten (DIECKMANN et al., 2008). MALDI-TOF MS erfasst insgesamt 70 bis 200 unterschiedliche Proteinpeaks, die den Aminosäuresequenzen von konstant exprimierten Haushaltsgenen zugeordnet werden können. Maximal 50 Peaks repräsentieren dabei ribosomale Proteine. Die restlichen Peaks werden Strukturproteinen wie unter anderem RNA-Chaperonen und DNA-bindenden Proteinen zugewiesen (WELKER (1) et al., 2011). Untersuchungen von *Campylobacter jejuni* konnten belegen, dass die bei der Subtypisierung erfassten Unterschiede der Proteinmassen bei den analysierten Stämmen auf Substitutionen einzelner Aminosäuren beruhten und nicht durch posttranslationale Modifikationen bedingt waren (FAGERQUIST et al., 2006). Die klassische, serologische Differenzierung der Serovare von *Leptospira* spp. beruht definitionsgemäß hingegen auf Variationen der Zuckerketten des LPS (CERQUEIRA et al., 2009) (siehe Diskussion, Publikation). Dieses oberflächlich exprimierte AG unterliegt je nach infiziertem Wirt oder Umweltbedingungen ständigen Variationen (AHMED et al., 2006). Kohlenhydrate werden mittels der in dieser Arbeit verwendeten MALDI-TOF-MS-Technologie jedoch nicht erfasst. Daher ist anzunehmen, dass die Leptospirenservare nicht mittels MALDI-TOF MS differenzierbar sind. Basierend auf dieser Tatsache sind die Ergebnisse der MALDI-TOF-Analysen mit der auf Unterschieden in den DNA-Sequenzen beruhenden genetischen Einteilung der Leptospirenstämme vergleichbar. Die ermittelten differenzierenden Proteinpeaks sind daher als stammspezifisch und nicht als serovarspezifisch anzusehen.

3 Interpretation und Vergleichbarkeit der molekularbiologischen Sequenzierungsmethoden mit den Ergebnissen des MALDI-TOF MS

Die Sequenzierung der 16S rRNA gilt als Goldstandard für die taxonomische Einteilung der Prokaryoten und ermöglicht eine Differenzierung des Genus oder der Spezies (WELKER (2), 2011). Die auf der MALDI-TOF-MS-Technologie beruhende Separierung der Bakterien kann mit den Ergebnissen der 16S-rRNA-Sequenzierung verglichen werden (SAUER et al., 2008; WELKER (1) et al., 2011).

Leptospira spp. können durch die Sequenzierung der 16S rRNA in pathogene, saprophytäre und intermediäre Leptospiren eingeteilt werden und die Genospezies können differenziert werden (CERQUEIRA et al., 2009). Dies gelang auch mit denen in dieser Arbeit verwendeten Leptospirenstämmen (Teilprojekt E Tabelle A2, Anhang).

Da viele Studien, welche sich mit der Typisierung von Bakterien mittels MALDI-TOF MS beschäftigten, keinen Vergleich mit etablierten genombasierten Typisierungsmethoden durchgeführt haben (MURRAY, 2010), wurden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Leptospirenstämme zusätzlich mittels MLST analysiert (Teilprojekt I Tabelle A2, Anhang) und die Ergebnisse mit den MALDI-TOF-Daten und den Ergebnissen der 16S-rRNA-Sequenzierung verglichen. Das MLST beruht auf der simultanen, partiellen Sequenzierung mehrerer Haushaltsgene (CERQUEIRA et al., 2009). Da diese Genloci stark konserviert sind, ist diese Methode sehr robust und reproduzierbar. Basierend auf der Publikation von Ahmed et al. wurden die sechs Gene *rrs2*, *icdA*, *secY*, *adk*, *LipL32* und *LipL41* verwendet, die alle auf dem Chromosom 1 im Leptospiren-Genom lokalisiert sind (Tabelle A4, Anhang) (AHMED et al., 2006). Das Fehlen von PCR-Produkten für bestimmte Leptospirenstämme kann durch den Verlust bestimmter Gene bei den einzelnen Genospezies erklärt werden (siehe Diskussion, Publikation und Abbildung A1, Anhang). Alle erstellten phylogenetischen Stammbäume zeigten zwei Hauptäste mit *L. borgpetersenii*, *L. weilli*, *L. alexanderi*, einerseits und *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii* andererseits. Im Vergleich zu den Stammbäumen der anderen Gene wies der Stammbaum des *rrs2*-Gens (16S rRNA) die geringste Separierung der Genospezies auf. Dies kann auf die bekannte Tatsache zurückgeführt werden, dass große Sequenzhomologien bei der 16S rRNA bei den Leptospirenserovaren vorhanden sind (MOREY et al., 2006). Von denen für das MLST verwendeten Genen besitzt das Gen *secY* dagegen die meisten polymorphen Sequenzbereiche (CERQUEIRA et al., 2009), was bei der Gegenüberstellung der Stammbäume des *rrs2*- und des *secY*-Gens deutlich wird (Abbildung 11).

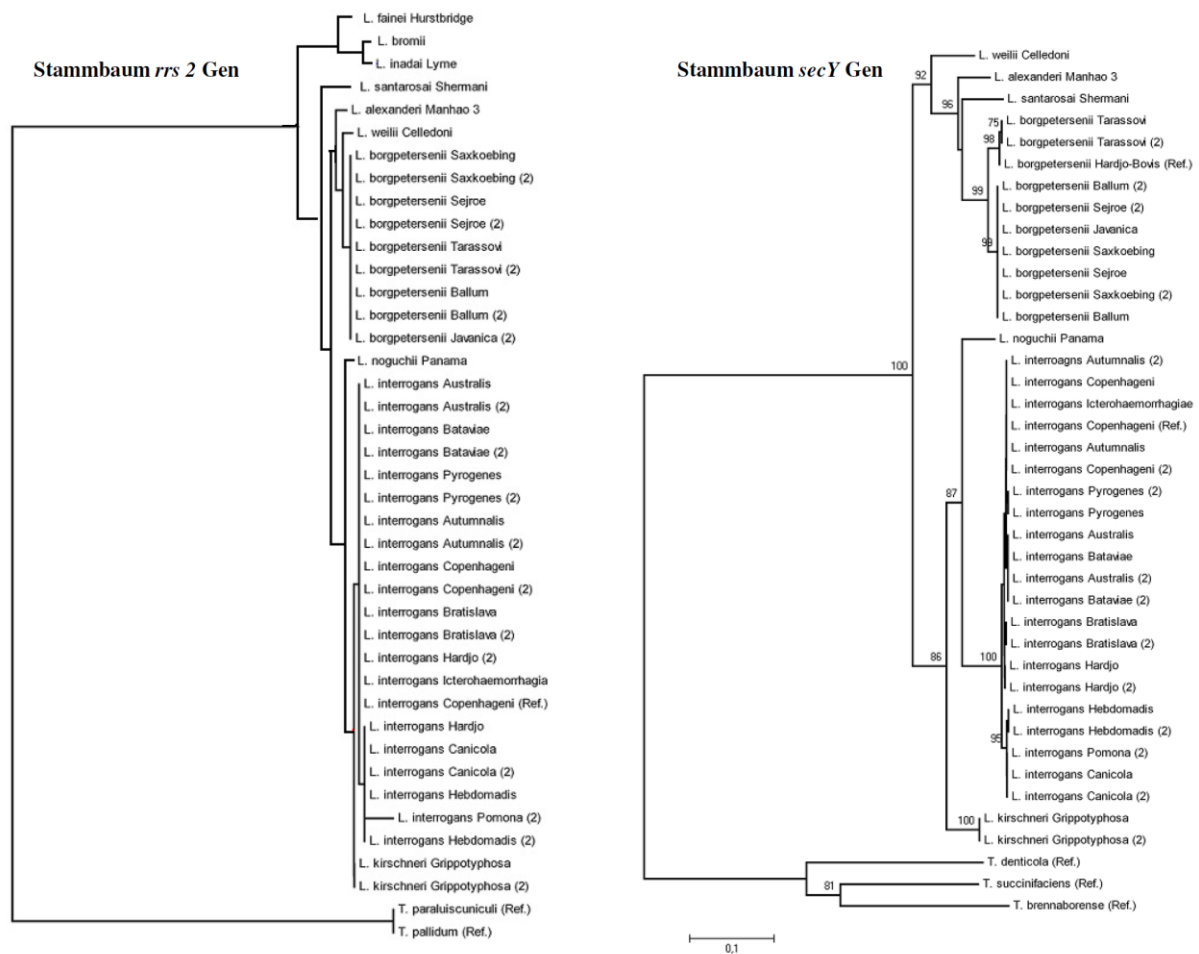


Abbildung 11: Gegenüberstellung der Stammbäume des *rrs2*- und *secY*-Gens (MLST)

- die Stammbäume stellen den Consensus Tree (Bootstrap 1000, Kimura 2 Parameter, Cut off 75%) dar
- die Sequenzen der analysierten Stämme des LGL sind mit einer (2) gekennzeichnet (Tabelle A3 Anhang)
- öffentlich zugängliche Referenzsequenzen der NCBI Genbank, die mit den erstellten Sequenzen abgeglichen wurden, sind mit (Ref.) gekennzeichnet

Durch das MLST konnten alle in dieser Arbeit verwendeten Leptospirenstämme sicher bis auf die Ebene der Genospezies differenziert werden. Beim Vergleich der Sequenzierungsergebnisse und der MALDI-TOF-Daten der Leptospirenstämme zeigten alle, im Rahmen dieser Arbeit erstellten phylogenetischen Stammbäume, eine vergleichbare Aufteilung wie das Dendrogramm der Referenzspektren (Figure 1, 4 und 5, Publikation und Abbildung 11). Ähnlich der Detektion mehrerer Haushaltsgene beim MLST, oder der 16S-rRNA-Sequenzierung können auch die mittels MALDI-TOF MS erfassten Haushaltsproteine als phylogenetische Marker angesehen werden (WELKER (1) et al., 2011), die so eine vergleichbare Differenzierung zu molekularbiologischen Typisierungsmethoden ermöglichen.

Im Vergleich zu aufwendigen Sequenzierungsmethoden ist MALDI-TOF MS für die

Differenzierung der Bakterienspezies aber standardisierter und breiter anwendbar. Zeitaufwendige Optimierungen für das Erreichen einer besseren Differenzierung wie sie bei molekularbiologischen Methoden notwendig sein können (CARBONNELLE et al., 2011), sind bei der MALDI-TOF-MS-Technologie nicht notwendig, da die Probenpräparation für verschiedene Bakterienspezies standardisiert anwendbar ist.

Aufgrund der Übereinstimmung der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Daten, kann MALDI-TOF MS daher als Alternative zu herkömmlichen, zeitaufwendigen Analyseverfahren, wie dem MLST, für die sichere Differenzierung der Genospezies von *Leptospira* spp. angesehen werden.

4 Anwendbarkeit des MALDI-TOF MS für den Nachweis von Leptospiren und Ausblick

In vielen diagnostischen, mikrobiologischen Laboren hat die MALDI-TOF-MS-Technologie bereits traditionelle biochemische und phänotypische Differenzierungsmethoden von Bakterien ersetzt (CARBONNELLE et al., 2012). Auch wenn die Methode vergleichsweise schneller durchgeführt werden kann als herkömmliche Methoden, ist eine kulturelle Anzucht der Erreger nach wie vor notwendig (WELKER (1) et al., 2011). Ein direkter Erregernachweis aus klinischem Material ist momentan schwierig und es sind sehr große Mengen des zu detektierenden Pathogens nötig. Die in klinischen Proben enthaltenen Proteine sowie die normale Mikroflora stören die Generierung der Proteinspektren (WIESER et al., 2011). Basierend auf der Pathogenese der Leptospirose sind für den direkten Nachweis von *Leptospira* spp. vor allem die klinischen Materialien Blut und Urin von Bedeutung. Der direkte Erregernachweis für andere Mikroorganismen, wie Staphylokokken, Enterokokken oder *Enterobacteriaceae*, mittels MALDI-TOF MS gelingt momentan nicht direkt aus Blutproben sondern nur aus Blutkulturen (KROUMOVA et al., 2011). Die in dieser Arbeit ermittelte benötigte hohe Bakteriendichte von 1×10^5 bis 1×10^6 Leptospiren/ml die, je nach angewendeter Präparationsmethode, für eine Spektrengenerierung notwendig ist, macht den direkten Nachweis von Leptospiren aus Blutproben mittels MALDI-TOF MS praktisch unmöglich. Zwar kann in der frühen Phase einer Infektion für kurze Zeit eine Konzentration von 10^6 bis 10^7 Leptospiren/ml im Blut erreicht werden, die Menge nimmt jedoch 4 bis 6 Tage p.i. mit dem Auftreten von spezifischen AK ab, bis der Erreger aus dem Blut eliminiert ist. In dieser frühen Phase treten jedoch noch keine klinischen Veränderungen auf (KO et al., 2009). Daher ist der Einsatz des MALDI-TOF MS für den direkten Erregernachweis aus dem Blut

äußerst limitiert und kann nicht empfohlen werden. In diesem Fall sind herkömmliche Methoden wie die PCR angezeigt, die bereits eine geringe Menge von Leptospiren-DNA detektieren kann (VILLUMSEN et al., 2012). Im Urin können Bakterien wie *E. coli*, *E. faecalis* und *P. aeruginosa* hingegen direkt mit einer Übereinstimmung von 91,8 % auf der Speziesebene mittels MALDI-TOF MS erfasst werden. Jedoch ist auch hierfür eine Mindestdichte von 10^5 Colony-Forming Units (CFU)/ml Bakterien für einen erfolgreichen Nachweis Voraussetzung (FERREIRA et al., 2010). Neben dem limitierenden Faktor der benötigten hohen Bakteriendichte werden Leptospiren mit dem Urin nur intermittierend ausgeschieden (LEVETT, 2001) und die Menge der Bakterien variiert in Abhängigkeit des Infektionsstadiums. Eine vorherige Anreicherung des Erregers ist zeitintensiv und kann bei der primären Isolierung bis zu 13 Wochen oder länger dauern (LEVETT, 2001). Daher ist die Anwendbarkeit des MALDI-TOF MS für den direkten Nachweis von Leptospiren aus klinischen Proben ohne vorherige kulturelle Anzucht als nicht praktikabel zu beurteilen und kann momentan nicht als diagnostisches Mittel verwendet werden.

Der notwendige Kultivierungsschritt stellt einen Nachteil dieser Technologie im Vergleich zu anderen, kulturunabhängigen Techniken wie der PCR dar. Wird die Technologie jedoch für bereits in Kulturen vorangereicherte Leptospiren verwendet, so ist MALDI-TOF MS eine standardisierte und schnelle Klassifizierungsmethode für *Leptospira* spp. Dies kann insbesondere dann von Interesse sein, wenn Laborstämme, die in Forschungslaboren oder diagnostischen Einrichtungen verwendet werden, auf mögliche Kreuzkontaminationen überprüft werden müssen oder die Genospeziesidentität nachgewiesen werden muss. Cerqueira et al. empfehlen für die Qualitätskontrolle von MAT-Stämmen die Sequenzierung der 16S rRNA, die eine Differenzierung der Genospezies ermöglicht (CERQUEIRA et al., 2010). Die sichere Bestimmung der Genospezies gelingt aber auch mittels MALDI-TOF MS. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Ergebnisse der 16S-rRNA-Sequenzierung und des MLST mit den Daten der MALDI-TOF-Analysen übereinstimmen.

Inwieweit MALDI-TOF MS auch für die Subtypisierung von Leptospirenstämmen angewendet werden kann, muss in Zukunft durch die Analyse weiterer Leptospirenstämmen ermittelt werden. Momentan ist die Anwendung der Subtypisierung aufgrund des komplizierten Analyseverfahrens noch auf den Forschungsbereich beschränkt. Durch weitere technische Verbesserung der Analysemethoden und Erweiterung der Datenbanken kann die taxonomische Separierungsstärke in Zukunft verbessert werden (WELKER (1) et al., 2011). Ob die Optimierung dieser noch neuen Technologie auch dazu führt, dass die noch nötige hohe Bakteriendichte reduziert werden kann und dadurch eventuell sogar die kulturelle Anzucht

nicht mehr notwendig ist, muss zukünftig untersucht werden.

Wie diese Arbeit belegt, stellt MALDI-TOF MS für die Differenzierung von in Kultur angereicherten *Leptospira* spp. eine vergleichbare und reproduzierbare Methode zu herkömmlichen molekularbiologischen Sequenzierungsmethoden dar und kann für die Genotypisierung und Überprüfung von Laborstämmen verwendet werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Familie der *Leptospiraceae* umfasst eine große Anzahl antigenetisch und genetisch unterschiedlicher Serovare und Stämme. Vertreter der pathogenen Genospezies stellen ein großes Problem mit hohem zoonotischen Potenzial in der Human- und Veterinärmedizin dar. Aufgrund der Pathogenese der Leptospirose und der großen Vielfalt des Erregers ist die Labordiagnostik kompliziert. Nach wie vor gilt der serologische Nachweis mittels MAT trotz starker Variationen bei den Testergebnissen und regionaler, epidemiologisch bedingter Unterschiede als Goldstandard in der Routinediagnostik. Neben der auf dem MAT basierenden serologischen Einteilung existiert ein auf genetischen Unterschieden beruhendes Einteilungsschema für *Leptospira* spp. Dabei werden die Serovare verschiedenen Genospezies zugeordnet die, basierend auf der Sequenzierung der 16S rRNA, in pathogene, apathogene und intermediäre Genospezies eingeteilt werden. Ähnlich wie bei der auf der Sequenzierung der 16S rRNA beruhenden, allgemein anerkannten taxonomischen Einteilung von Bakterien, erfasst auch MALDI-TOF MS, auf der Proteinebene, Variationen der Aminosäuresequenzen der detektierten Haushaltsgene. Die analysierten Gene kodieren neben Strukturproteinen zum größten Teil für ribosomale Proteine. Die bei der MALDI-TOF-MS-Technologie untersuchten Proteinspektren sind für jede Bakterienspezies und jeden Bakterienstamm spezifisch und ermöglichen neben der Identifizierung klinischer Isolate auf Genus- oder Speziesebene auch eine taxonomische Einteilung von Bakterien, die mit der Sequenzierung der 16S rRNA vergleichbar ist.

Für die Genotypisierung der in dieser Arbeit verwendeten Leptospirenstämme wurde neben der Sequenzierung der 16S rRNA ein auf sechs Haushaltsgenen beruhendes MLST durchgeführt. Dabei konnten mit beiden Methoden apathogene, pathogene und intermediäre Stämme sowie die Genospezies sicher differenziert werden. Eine Unterscheidung von Stämmen oder Serovaren innerhalb einer Genospezies gelang mittels der Sequenzierung nicht.

Für die Detektion von Leptospiren mittels MALDI-TOF MS wurde ein Extraktionsprotokoll für in Kultur angereicherte *Leptospira* spp. etabliert. Die erstellte Referenzdatenbank umfasste insgesamt 28 verschiedene Stämme apathogener, intermediärer und pathogener Leptospiren. Mittels Probemessungen mit den definierten Laborstämmen sowie mit 16 Feldisolaten wurde die Qualität der in der Datenbank hinterlegten Referenzspektren evaluiert. Dabei konnte eine mit den durchgeführten Sequenzierungsmethoden übereinstimmende Separierung der Genospezies erreicht werden. In einem Fall war die Bestimmung der richtigen Genospezies mittels MALDI-TOF MS jedoch nicht möglich. Neben dem Abgleich mit dem

Referenzspektrum der richtigen Genospezies wurde das Feldisolat *L. kirschneri* Serovar Grippotyphosa auch mit einem Referenzspektrum der phylogenetisch eng verwandten Genospezies *L. interrogans* abgeglichen. In diesem Fall konnte die richtige Genospezies nur durch die durchgeführte Sequenzierung der 16S rRNA ermittelt werden. Weiterführende Analysen für die Detektion differenzierender, stammspezifischer Proteinpeaks wurden mit den Stämmen der Genospezies *L. interrogans*, *L. kirschneri* und *L. borgpetersenii* durchgeführt, die als Hauptverursacher der Leptospirose gelten. Die Analyse beruhte dabei sowohl auf dem visuellen Vergleich der Proteinspektren als auch auf der Analyse der Proteinspektren mit der statistischen Software ClinProTools. Dabei wurden reproduzierbar differenzierende Proteinpeaks innerhalb der Genospezies *L. borgpetersenii* für die Serovare Saxkoebing, Tarassovi und innerhalb der Genospezies *L. interrogans* für die Serovare Pomona, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae sowie Australis ermittelt. Das Serovar Grippotyphosa der Genospezies *L. kirschneri* unterschied sich nur durch einen Proteinpeak bei 8.097 Da von den Stämmen der *L. interrogans* Spezies, was die bereits bekannte phylogenetisch enge Verwandtschaft der beiden Genospezies bestätigt. Für die Beurteilung der taxonomischen Differenzierung von Leptospiren mittels MALDI-TOF MS im Vergleich zu etablierten molekularbiologischen Methoden wurden die Referenzspektren in einem Dendrogramm dargestellt und mit den erstellten phylogenetischen Stammbäumen der 16S-rRNA-Sequenzierung und des MLST verglichen. Die Separierung der Genospezies und die Zuordnung zu pathogenen, intermediären und apathogenen Leptospirenstämmen, stimmten bei allen verwendeten Methoden überein.

MALDI-TOF MS ermöglicht daher eine mit DNA-Sequenzierungsmethoden vergleichbare Differenzierung der Genospezies von *Leptospira* spp. Darüber hinaus konnte durch weiterführende Analysen der Proteinreferenzspektren stammspezifische Proteinpeaks für sieben Leptospirenstämme innerhalb der analysierten pathogenen Genospezies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* und *L. kirschneri* mittels MALDI-TOF MS ermittelt werden.

MALDI-TOF MS ist für die Identifizierung von *Leptospira* spp. schneller, standardisierter und mit einem geringeren Aufwand durchführbar als herkömmliche Gensequenzierungen. MALDI-TOF MS kann daher für die Überprüfung von Laborstämmen oder für den Nachweis möglicher Kreuzreaktivitäten durch Kontaminationen bei MAT-Kulturen verwendet werden und bietet eine Alternative zu zeitaufwendigeren molekularen Typisierungsmethoden.

VI. SUMMARY

The family *Leptospiraceae* consists of a wide variety of genetic and antigenic diverse leptospiral serovars and strains. Representatives of the pathogenic genomospecies are known to have a zoonotic potential and are important pathogens in human and veterinary medicine. Detection of the pathogen is still complicated due to the complex pathogeneses of the disease and the wide diversity of leptospiral strains. Even though it is known that big varieties of the test results occur, the microscopic agglutination test (MAT) is still said to be the gold standard in routine diagnostics. Interpretation of the MAT test is complicated since regional differences and the epidemiological situation do have an impact on the test result. Despite the MAT-based, serological classification scheme a second genetic classification system, exists in which leptospiral serovars are classified into different genomospecies according to their genetic diversity. Based on the sequencing of the 16S rRNA the genomospecies can further be assigned to pathogenic, non-pathogenic and intermediate species. 16S rRNA sequencing is considered to be the gold standard for the taxonomic classification of bacteria. MALDI-TOF MS analysis can be compared to this genetic classification scheme as this technology comprises variations of the amino acid sequences of the detected housekeeping genes on protein level. These housekeeping genes mainly encode for ribosomal proteins and some structural proteins. MALDI-TOF MS detects and compares the protein spectra that are specific for each bacteria species. Using this technology, clinical isolates can be identified to genus- species- or strain level. Furthermore, the taxonomic classification of bacteria using MALDI-TOF MS can be compared to the 16S rRNA sequencing.

Genotyping of the leptospiral strains used in this approach was based on 16S rRNA sequencing and multilocus sequence typing (MLST). The used MLST scheme is based on six housekeeping genes. Separation of pathogenic, non-pathogenic and intermediate species and the identification of the correct genomospecies are possible with both sequencing methods. Further differentiation of leptospiral strains or serovars is not successful.

In order to use MALDI-TOF MS for the detection of *Leptospira* spp., an extraction protocol was established for leptospiral strains grown in liquid media. Reference spectra, in the following called MSPs (main spectral projections) of 28 leptospiral strains, comprising pathogenic, non-pathogenic and intermediate strains, were created and implemented in a reference database. To assure appropriate quality of the MSPs multiple measurements with the defined cultured leptospiral strains and with 16 field isolates, were performed. Comparable separation to the sequence analyses was achieved for pathogenic, intermediate, non-pathogenic

strains and for the identification of the genomospecies. No clear identification of the genomospecies was achieved in one case. In this case the field isolate *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa was not correctly identified by MALDI-TOF MS and matched with one MSP of the phylogenetic close related genomospecies *L. interrogans*. Sequencing of the 16S rRNA confirmed the correct genomospecies. To detect discriminating, strain-specific protein peaks, further analyses were carried out with leptospiral strains belonging to the genomospecies *L. interrogans*, *L. kirschneri* and *L. borgpetersenii*. These three species are said to be the main causative agents of leptospiroses. For this purpose all spectra were visually screened for homologies and differences in their protein profiles and in addition, statistical analyses were applied using the software ClinProTools. Discriminating protein peaks were reproducibly detected within the genomospecies *L. borgpetersenii* for the serovars Saxkoebing, Tarassovi, and within the genomospecies *L. interrogans* for the serovars Pomona, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae and Australis. Protein profiles of the *L. interrogans* and *L. kirschneri* strains could only be separated by one additional protein peak at 8,097 Dalton (Da) belonging to the serovar Grippotyphosa of the genomospecies *L. kirschneri*. This confirms the well-known phylogenetic close relationship of these two species.

To evaluate, if the taxonomic separation of the analyzed leptospiral strains using MALDI-TOF MS can be compared to the molecular typing results, both methods were directly compared to each other. For this purpose the reference spectra of the leptospiral strains were displayed in a MSP dendrogram and compared to the constructed phylogenetic trees of the 16S rRNA sequencing and the MLST analysis. Comparable separation of pathogenic, non-pathogenic and intermediate strains and the genomospecies was achieved with all typing methods. Therefore MALDI-TOF MS shows comparable results to DNA sequencing methods for the genotyping of *Leptospira* spp. In addition, further analysis revealed strain-specific peaks for seven leptospiral strains within the genomospecies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* and *L. kirschneri* using MALDI-TOF MS.

Compared to time consuming sequencing methods MALDI-TOF MS is a fast and standardized applicable method for the identification of *Leptospira* spp. MALDI-TOF MS can be used to identify cultured leptospiral strains and to track possible cross contaminations of MAT panels and is therefore an alternative to elaborate molecular typing methods.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Adler B, de la Pena MA. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet.Microbiol.* 2010; 140:287-296.

Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet.Microbiol.* 2011; 153:73-81.

Agunloye CA, Nash AS. Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. *J.Small Anim Pract.* 1996; 37:126-129.

Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *leptospira* species in clinical materials. *PLoS.One.* 2009; 4:e7093.

Ahmed A, Thaipadungpanit J, Boonsilp S, Wuthiekanun V, Nalam K, Spratt BG, Aanensen DM, Smythe LD, Ahmed N, Feil EJ, Hartskeerl RA, Peacock SJ. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2011; 5:e1374.

Ahmed N, Devi SM, Valverde ML, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann.Clin.Microbiol.Antimicrob.* 2006; 5:28.

Alatoom AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J.Clin.Microbiol.* 2011; 49:2868-2873.

Albrethsen J. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin.Chem.* 2007; 53:852-858.

Alt DP, Zuerner RL, Bolin CA. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 2001; 219:636-639.

Alton GD, Berke O, Reid-Smith R, Ojkic D, Prescott JF. Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998-2006. *Can.J.Vet.Res.* 2009; 73:167-175.

Andre-Fontaine G. Canine leptospirosis--do we have a problem? *Vet.Microbiol.* 2006; 117:19-24.

Ayyadurai S, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC.Microbiol.* 2010; 10:285.

Babudieri B. Animal reservoirs of leptospires. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1958; 70:393-413.

Baverud V, Gunnarsson A, Engvall EO, Franzen P, Egenvall A. *Leptospira* seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. *Acta Vet.Scand.* 2009; 51:15.

Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS.One.* 2011; 6:e16424.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect.Dis.* 2003; 3:757-771.

Birnbaum N, Barr SC, Center SA, Schermerhorn T, Randolph JF, Simpson KW. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *J.Small Anim Pract.* 1998; 39:231-236.

Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J.Clin.Microbiol.* 2010; 48:1549-1554.

Blondiaux N, Gaillot O, Courcol RJ. [MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: evaluation in a teaching hospital in Lille]. *Pathol.Biol.(Paris)* 2010; 58:55-57.

Bolin CA. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Semin.Vet.Med.Surg.(Small Anim)* 1996; 11:166-171.

Bolin CA, Cassells JA, Hill HT, Frantz JC, Nielsen JN. Reproductive failure associated with *Leptospira interrogans* serovar bratislava infection of swine. *J.Vet.Diagn.Invest* 1991; 3:152-154.

Brandes K, Wollanke B, Niedermaier G, Brem S, Gerhards H. Recurrent uveitis in horses: vitreal examinations with ultrastructural detection of leptospire. *J.Vet.Med.A Physiol Pathol.Clin.Med.* 2007; 54:270-275.

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1999; 49:839-858.

Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, Van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard CO, Terpstra WJ, Levett PN. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J.Med.Microbiol.* 1995; 43:110-114.

Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006; 103:14560-14565.

Carbonnelle E, Grohs P, Jacquier H, Day N, Tenza S, Dewailly A, Vissouarn O, Rottman M, Herrmann JL, Podglajen I, Raskine L. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *J.Microbiol.Methods* 2012; 89:133-136.

Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin.Biochem.* 2011; 44:104-109.

Cerqueira GM, McBride AJ, Queiroz A, Pinto LS, Silva EF, Hartskeerl RA, Reis MG, Ko AI,

- Dellagostin OA. Monitoring *Leptospira* strain collections: the need for quality control. Am.J.Trop.Med.Hyg. 2010; 82:83-87.
- Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. Infect.Genet.Evol. 2009; 9:760-768.
- Chakraborty A, Takade A, Villanueva SY, Yoshida S. Electron microscopic study of the effects of antimicrobial Agents on the cellular architecture of *Leptospira*. J.Infect.Chemother. 2011; 17:872-875.
- Chappel RJ, Goris M, Palmer MF, Hartskeerl RA. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. J.Clin.Microbiol. 2004; 42:5484-5488.
- Chassin C, Picardeau M, Goujon JM, Bourhy P, Quellard N, Darche S, Badell E, d'Andon MF, Winter N, Lacroix-Lamande S, Buzoni-Gatel D, Vandewalle A, Werts C. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. J.Immunol. 2009; 183:2669-2677.
- Chierakul W, Tientadakul P, Suputtamongkol Y, Wuthiekanun V, Phimda K, Limpai boon R, Opartkiattikul N, White NJ, Peacock SJ, Day NP. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. Clin.Infect.Dis. 2008; 46:254-260.
- Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. Infect.Immun. 2007; 75:2441-2450.
- Cinco M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. New Microbiol. 2010; 33:283-292.
- Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. Nat.Biotechnol. 1996; 14:1584-1586.
- Cortese VS, Behan S, Galvin JE, Penka DR, Ramsey D, Bryson WL, Lucas MJ. Evaluation of two antimicrobial therapies in the treatment of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo infection in experimentally infected cattle. Vet.Ther. 2007; 8:201-208.
- Croda J, Ramos JG, Matsunaga J, Queiroz A, Homma A, Riley LW, Haake DA, Reis MG, Ko AI. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. J.Clin.Microbiol. 2007; 45:1528-1534.
- Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. FEMS Microbiol.Rev. 2004; 28:291-318.
- Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Infect.Immun. 2003; 71:2414-2421.
- Cumberland P, Everard CO, Wheeler JG, Levett PN. Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979-1989. Eur.J.Epidemiol. 2001; 17:601-608.
- Curling A. Equine recurrent uveitis: classification, etiology, and pathogenesis. Compend.Contin.Educ.Vet. 2011; 33:E1-E4.

Curling A. Equine recurrent uveitis: treatment. *Compend.Contin.Educ.Vet.* 2011; 33:E1-E4.

de Abreu FC, Teixeira de Freitas VL, Calo RE, Spinosa C, Arroyo Sanches MC, da Silva MV, Shikanai-Yasuda MA. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. *Trop.Med.Int.Health* 2006; 11:1699-1707.

De BT, Bohm GM, Yasuda PH. Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea-pig. *J.Pathol.* 1979; 128:177-182.

Desai S, van TU, Lierz M, Espelage W, Zota L, Sarbu A, Czerwinski M, Sadkowska-Todys M, Avdicova M, Reetz J, Luge E, Guerra B, Nockler K, Jansen A. Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clin.Infect.Dis.* 2009; 48:691-697.

Dhiman N, Hall L, Wohlfel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J.Clin.Microbiol.* 2011; 49:1614-1616.

Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl.Environ.Microbiol.* 2008; 74:7767-7778.

Dietz O, B Huskamp. *Handbuch Pferdepraxis*. 3th edition: 2006; 698-699 und 775-786.

Dirksen G, Gründer H, Stöber M. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. 4th Edition 2002; 709-712.

Drake RR, Boggs SR, Drake SK. Pathogen identification using mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J.Mass Spectrom.* 2011; 46:1223-1232.

Ellis WA. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Vet.Rec.* 2010; 167:602-605.

Ellis WA, O'Brien JJ, Neill SD, Bryson DG. Bovine leptospirosis: experimental serovar hardjo infection. *Vet.Microbiol.* 1986; 11:293-299.

Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future.Microbiol.* 2010; 5:1413-1425.

Fagerquist CK, Bates AH, Heath S, King BC, Garbus BR, Harden LA, Miller WG. Sub-speciating *Campylobacter jejuni* by proteomic analysis of its protein biomarkers and their post-translational modifications
15. *J.Proteome.Res.* 2006; 5:2527-2538.

Faine S. Virulence in *Leptospira*. I. Reactions of guinea-pigs to experimental infection with *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Br.J.Exp.Pathol.* 1957; 38:1-7.

Faucher JF, Hoen B, Estavoyer JM. The management of leptospirosis. *Expert.Opin.Pharmacother.* 2004; 5:819-827.

Felix SR, Hartwig DD, Argondizzo AP, Silva EF, Seixas FK, Neto AC, Medeiros MA, Lilenbaum W, Dellagostin OA. Subunit approach to evaluation of the immune protective potential of leptospiral antigens. *Clin.Vaccine Immunol.* 2011; 18:2026-2030.

- Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom.Rev.* 2001; 20:157-171.
- Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, Munoz-Bellido JL. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J.Clin.Microbiol.* 2010; 48:2110-2115.
- Fonseca CA, Teixeira MM, Romero EC, Tengan FM, Silva MV, Shikanai-Yasuda MA. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. *J.Infect.* 2006; 52:15-22.
- Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand.J.Immunol.* 2011; 73:408-419.
- Freiwald A, Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat.Protoc.* 2009; 4:732-742.
- Geisen V, Stengel C, Brem S, Muller W, Greene C, Hartmann K. Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *J.Small Anim Pract.* 2007; 48:324-328.
- Givens MD. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology* 2006; 66:648-654.
- Goldstein RE. Canine leptospirosis. *Vet.Clin.North Am.Small Anim Pract.* 2010; 40:1091-1101.
- Grassmann AA, Felix SR, Ximendes Dos SC, Amaral MG, Seixas Neto AC, Fagundes MQ, Seixas FK, da Silva EF, Conceicao FR, Dellagostin OA. Protection against Lethal Leptospirosis after Vaccination with LipL32 Coupled or Coadministered with the B Subunit of *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin
1. *Clin.Vaccine Immunol.* 2012; 19:740-745.
- Greene CE. *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 4th Edition 2012; 431-446.
- Guerra MA. Leptospirosis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 2009; 234:472.8-430.
- Guitian FJ, Garcia-Pena FJ, Oliveira J, Sanjuan ML, Yus E. Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. *Vet.Microbiol.* 2001; 80:275-284.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect.Immun.* 2000; 68:2276-2285.
- Haake DA, Martinich C, Summers TA, Shang ES, Pruetz JD, McCoy AM, Mazel MK, Bolin CA. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect.Immun.* 1998; 66:1579-1587.
- Haake DA, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect.Immun.* 2002; 70:4936-4945.

- Haake DA, Matsunaga J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. *Mol.Microbiol.* 2010; 77: 805-814.
- Hamond C, Martins G, Lilenbaum W. Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. *Trop.Anim Health Prod.* 2012.
- Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin.Microbiol.Infect.* 2011; 17:494-501.
- Heinritzi K, HR Gindele, G Reiner, U Schnurrbusch. *Schweinekrankheiten.* 2006; 126-127 und 258-259
- Hettick JM, Kashon ML, Slaven JE, Ma Y, Simpson JP, Siegel PD, Mazurek GN, Weissman DN. Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. *Proteomics.* 2006; 6:6416-6425.
- Ido Y, Hoki R, Ito H, Wani H. The prophylaxis of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *J.Exp.Med.* 1916; 24:471-483.
- Ido Y, Hoki R, Ito H, Wani H. The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *J.Exp.Med.* 1917; 26:341-353.
- IfSG. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen. 3. Abschnitt - Meldewesen § 7; Erstauflage 2000, in der Fassung von 2011.
- Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *J.Exp.Med.* 1916; 23:377-402.
- Jansen A, Schoneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerg.Infect.Dis.* 2005; 11:1048-1054.
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal.Chem.* 1988; 60:2299-2301.
- Kingscote BF. Diagnosis of *Leptospira* serovar hardjo Infection in Cattle in Canada. *Can.Vet.J.* 1985; 26:270-274.
- Klarenbeek A, Schüffner WAP. Het voorkomen van een afwijkend leptospira-ras in Nederland. *Ned.Tijdschr.Geneesk.* 1933; 77:4276.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat.Rev.Microbiol.* 2009; 7:736-747.
- Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, Mizutani H, Sohmura Y, Hayashi E, Akao N, Hoshino M, Kawabata H, Watanabe H. Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. *J.Med.Microbiol.* 2009; 58:1227-1230.
- Kroumova V, Gobbato E, Basso E, Mucedola L, Giani T, Fortina G. Direct identification of bacteria in blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new methodological approach. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 2011; 25:2247-2249.

Lartigue MF, Hery-Arnaud G, Haguenoer E, Domelier AS, Schmit PO, Mee-Marquet N, Lanotte P, Mereghetti L, Kostrzewa M, Quentin R. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J.Clin.Microbiol.* 2009; 47:2284-2287.

Le Febvre RB, Foley JW, Thiermann AB. Rapid and simplified protocol for isolation and characterization of leptospiral chromosomal DNA for taxonomy and diagnosis. *J.Clin.Microbiol.* 1985; 22:606-608.

LeFebvre RB, Thiermann AB, Foley J. Genetic and antigenic differences of serologically indistinguishable leptospires of serovar hardjo. *J.Clin.Microbiol.* 1987; 25:2094-2097.

Levett PN. Leptospirosis. *Clin.Microbiol.Rev.* 2001; 14:296-326.

Li S, Ojcius DM, Liao S, Li L, Xue F, Dong H, Yan J. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. *Innate.Immun.* 2010; 16:80-92.

Lilenbaum W, Varges R, Brandao FZ, Cortez A, de Souza SO, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology* 2008; 69:837-842.

Lilenbaum W, Varges R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res.Vet.Sci.* 2009; 87:16-19.

Liu Y, Zheng W, Li L, Mao Y, Yan J. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells. *Med.Microbiol.Immunol.* 2007; 196:233-239.

Lourdault K, Aviat F, Picardeau M. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J.Med.Microbiol.* 2009; 58:648-655.

Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu.Rev.Microbiol.* 2006; 60:561-588.

Martins G, Penna B, Hamond C, Leite RC, Silva A, Ferreira A, Brandao F, Oliveira F, Lilenbaum W. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Trop.Anim Health Prod.* 2011; 44:773-777.

Matsunaga J, Medeiros MA, Sanchez Y, Werneid KF, Ko AI. Osmotic regulation of expression of two extracellular matrix-binding proteins and a haemolysin of *Leptospira interrogans*: differential effects on LigA and Sph2 extracellular release. *Microbiology* 2007; 153:3390-3398.

Matsunaga J, Werneid K, Zuerner RL, Frank A, Haake DA. LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. *Microbiology* 2006; 152:3777-3786.

McBride AJ, Santos BL, Queiroz A, Santos AC, Hartskeerl RA, Reis MG, Ko AI. Evaluation of four whole-cell *Leptospira*-based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. *Clin.Vaccine Immunol.* 2007; 14:1245-1248.

- McINTYRE WI, MONTGOMERY GL. Renal lesions in *Leptospira canicola* infection in dogs. *J.Pathol.Bacteriol.* 1952; 64:145-160.
- Midence JN, Leutenegger CM, Chandler AM, Goldstein RE. Effects of recent *Leptospira* vaccination on whole blood real-time PCR testing in healthy client-owned dogs. *J.Vet.Intern.Med.* 2012; 26:149-152.
- Miller MD, Annis KM, Lappin MR, Lunn KF. Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. *J.Vet.Intern.Med.* 2011; 25:426-432.
- Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW, Levett PN. Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. *J.Clin.Microbiol.* 2006; 44:3510-3516.
- Murray PR. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin.Microbiol.Infect.* 2010; 16:1626-1630.
- Nalam K, Ahmed A, Devi SM, Francalacci P, Baig M, Sechi LA, Hartskeerl RA, Ahmed N. Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology. *PLoS.One.* 2010; 5:e12637.
- Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CF, Leite LC, Carrer H, Coutinho LL, Degraive WM, Dellagostin OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MI, Furlan LR, Gamberini M, Giglioti EA, Goes-Neto A, Goldman GH, Goldman MH, Harakava R, Jeronimo SM, Junqueira-de-Azevedo IL, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EG, Lemos MV, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schriefer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJ, Ferro JA, Camargo LE, Kitajima JP, Setubal JC, Van Sluys MA. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J.Bacteriol.* 2004; 186:2164-2172.
- Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Digiampietri LA, Harstkeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC, Setubal JC, Haake DA, Martins EA. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 2004; 37:459-477.
- Nicodemo AC, Duarte MI, Alves VA, Takakura CF, Santos RT, Nicodemo EL. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1997; 56:181-187.
- Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 2007; 20:284-292.
- Pappas G, Cascio A. Optimal treatment of leptospirosis: queries and projections. *Int.J.Antimicrob.Agens* 2006; 28:491-496.
- Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int.J.Infect.Dis.* 2008; 12:351-357.
- Park SK, Lee SH, Rhee YK, Kang SK, Kim KJ, Kim MC, Kim KW, Chang WH. Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1989; 41:345-351.

- Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Coppel RL, Rood JI, Lajus A, Davies JK, Medigue C, Adler B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. PLoS.One. 2008; 3:e1607.
- Pinne M, Choy HA, Haake DA. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. PLoS.Negl.Trop.Dis. 2010; 4:e815.
- Radl C, Muller M, Revilla-Fernandez S, Karner-Zuser S, de MA, Schauer U, Karner F, Stanek G, Balcke P, Hallas A, Frank H, Furnschliel A, Erhart F, Allerberger F. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Langau, Austria, 2010. Wien.Klin.Wochenschr. 2011; 123:751-755.
- Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD, Santana FS, Mohr S, Melendez AX, Queiroz A, Santos AC, Ravines RR, Tassinari WS, Carvalho MS, Reis MG, Ko AI. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. PLoS.Negl.Trop.Dis. 2008; 2:e228.
- Rinehart CL, Zimmerman AD, Buterbaugh RE, Jolie RA, Chase CC. Efficacy of vaccination of cattle with the *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjoprajitno component of a pentavalent *Leptospira* bacterin against experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis. Am.J.Vet.Res. 2012; 73:735-740.
- Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW, Figueira CP, Huerre M, Ave P, Girons IS, Ko AI, Picardeau M. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. PLoS.Pathog. 2007; 3:e97.
- Robert Koch Institut. Epidemiologisches Bulletin. Nr.II 2008.
- Romero EC, Blanco RM, Galloway RL. Analysis of multilocus sequence typing for identification of *Leptospira* isolates in Brazil. J.Clin.Microbiol. 2011; 49:3940-3942.
- Rossello-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiol.Rev. 2001; 25:39-67.
- Ryan EG, Leonard N, O'Grady L, More SJ, Doherty ML. Seroprevalence of *Leptospira* Hardjo in the Irish suckler cattle population. Ir.Vet.J. 2012; 65:8.
- Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. PLoS.One. 2008; 3:e2843.
- Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nat.Rev.Microbiol. 2010; 8:74-82.
- Schmid MA. Prävalenz von Leptospirenantikörpern in bayrischen Rinderherden und von Leptospiren bei abortierten Rinderfeten. Dissertation, Tierärztliche Fakultät der LMU München. 2005.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La SB, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin.Infect.Dis. 2009; 49:543-551.

Shang ES, Exner MM, Summers TA, Martinich C, Champion CI, Hancock RE, Haake DA. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect.Immun.* 1995; 63:3174-3181.

Silva EF, Brod CS, Cerqueira GM, Bourscheidt D, Seyffert N, Queiroz A, Santos CS, Ko AI, Dellagostin OA. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. *Vet.Microbiol.* 2007; 121:144-149.

Silva EF, Cerqueira GM, Seyffert N, Seixas FK, Hartwig DD, Athanazio DA, Pinto LS, Queiroz A, Ko AI, Brod CS, Dellagostin OA. *Leptospira noguchii* and human and animal leptospirosis, Southern Brazil. *Emerg.Infect.Dis.* 2009; 15:621-623.

Slack A, Symonds M, Dohnt M, Harris C, Brookes D, Smythe L. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* 2007; 57:361-366.

Socolovschi C, Angelakis E, Renvoise A, Fournier PE, Marie JL, Davoust B, Stein A, Raoult D. Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *Int.J.Infect.Dis.* 2011; 15:e710-e715.

Srivastava SK. Prospects of developing leptospiral vaccines for animals. *Indian J.Med.Microbiol.* 2006; 24:331-336.

Stephan R, Ziegler D, Pfluger V, Vogel G, Lehner A. Rapid genus- and species-specific identification of *Cronobacter* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J.Clin.Microbiol.* 2010; 48:2846-2851.

Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, Demoll E, Kraiczy P, Cooley AE, Creamer TP, Suchard MA, Brissette CA, Verma A, Haake DA. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS.One.* 2007; 2:e1188.

StIKo Vet. Leitlinien zur Impfung von Kleintieren. abrufbar über www.tieraerzteverband.de 2009.

StIKo Vet. Leitlinie zur Impfung von Pferden. abrufbar über www.tieraerzteverband.de 2011.

Strutzberg-Minder K, Kreienbrock L. [Leptospire infections in pigs: epidemiology, diagnostics and worldwide occurrence]. *Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr.* 2011; 124:345-359.

Sun A, Wang Y, DU P, Wu S, Yan J. A sensitive and specific IgM-ELISA for the serological diagnosis of human leptospirosis using a rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion protein. *Biomed.Envirn.Sci.* 2011; 24:291-299.

Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *J.Vet.Intern.Med.* 2011; 25:1-13.

Szeredi L, Haake DA. Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by leptospiral infection. *Vet.Pathol.* 2006; 43:755-761.

Tajiki H, Salomao R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity

of disease and mortality among patients with leptospirosis. *Clin.Infect.Dis.* 1996; 23:1177-1178.

Teramoto K, Sato H, Sun L, Torimura M, Tao H. A simple intact protein analysis by MALDI-MS for characterization of ribosomal proteins of two genome-sequenced lactic acid bacteria and verification of their amino acid sequences. *J.Proteome.Res.* 2007; 6:3899-3907.

Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpai boon R, Apiwatanaporn A, Slack AT, Suputtamongkol Y, White NJ, Feil EJ, Day NP, Peacock SJ. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2007; 1:e56.

Timoney JF, Kalimuthusamy N, Velineni S, Donahue JM, Artiushin SC, Fetting M. A unique genotype of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type kennewicki is associated with equine abortion. *Vet.Microbiol.* 2011; 150:349-353.

TKrMeldepflV. Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten. Anhang zu § 1, Erstaufgabe 1983, in der Fassung von 2011.

Toyokawa T, Ohnishi M, Koizumi N. Diagnosis of acute leptospirosis. *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.* 2011; 9:111-121.

Trevejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, Amador JJ, de los Reyes JO, Gonzalez A, Zaki SR, Shieh WJ, McLean RG, Nasci RS, Weyant RS, Bolin CA, Bragg SL, Perkins BA, Spiegel RA. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J.Infect.Dis.* 1998; 178:1457-1463.

Van De Weyer LM, Hendrick S, Rosengren L, Waldner CL. Leptospirosis in beef herds from western Canada: serum antibody titers and vaccination practices. *Can.Vet.J.* 2011; 52:619-626.

van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J.Clin.Microbiol.* 2010; 48:900-907.

van dM, I, Claus A, Haesebrouck F, Daminet S. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *Vet.Rec.* 2008; 163:409-413.

Verma A, Artiushin S, Matsunaga J, Haake DA, Timoney JF. LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic *Leptospira interrogans* associated with equine recurrent uveitis. *Infect.Immun.* 2005; 73:7259-7266.

Vernel-Pauillac F, Goarant C. Differential cytokine gene expression according to outcome in a hamster model of leptospirosis. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2010; 4:e582.

Vestal ML. The future of biological mass spectrometry. *J.Am.Soc.Mass Spectrom.* 2011; 22:953-959.

Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. Novel TaqMan(R) PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation 3. *J.Microbiol.Methods* 2012.

Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow DC. Sporadic urban leptospirosis. *Ann.Intern.Med.* 1996; 125:794-798.

Wang H, Wu Y, Ojcius DM, Yang XF, Zhang C, Ding S, Lin X, Yan J. Leptospiral Hemolysins Induce Proinflammatory Cytokines through Toll-Like Receptor 2-and 4-Mediated JNK and NF-kappaB Signaling Pathways. PLoS.One. 2012; 7:e42266.

Wang Z, Jin L, Wegrzyn A. Leptospirosis vaccines. Microb.Cell Fact. 2007; 6:39.

Weil A. Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit. Dtsche.Arch.Klin.Med. 1886; 39:209-232.

Welker (1) M, Moore ER. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. Syst.Appl.Microbiol. 2011; 34:2-11.

Welker (2) M. Proteomics for routine identification of microorganisms. Proteomics. 2011; 11:3143-3153.

Werno AM, Christner M, Anderson TP, Murdoch DR. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from non-pneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* group by MALDI-TOF MS. J.Clin.Microbiol. 2012; 50:2863-2867.

Werts C. Leptospirosis: a Toll road from B lymphocytes. Chang Gung.Med.J. 2010; 33:591-601.

Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint G, I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. Nat.Immunol. 2001; 2:346-352.

Whitwell KE, Blunden AS, Miller J, Errington J. Two cases of equine pregnancy loss associated with *Leptospira* infection in England. Vet.Rec. 2009; 165:377-378.

WHO Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control.2003 .

WHO. Report of the Second Meeting of the Leptospirosis burden Epidemiology Reference Group. Department of food Safety and Zoonoses: Geneva, Switzerland 2011.

Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). Appl.Microbiol.Biotechnol. 2011; 93:965-974.

Yan KT, Ellis WA, Mackie DP, Taylor MJ, McDowell SW, Montgomery JM. Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle. Vet.Microbiol. 1999; 69:173-187.

Yang CW, Hung CC, Wu MS, Tian YC, Chang CT, Pan MJ, Vandewalle A. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. Kidney Int. 2006; 69:815-822.

Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals of Seven New *Leptospira* Species. Int.J.Syst.Bacteriol. 1987; 37 No. 4:407-415.

Zakeri S, Khorami N, Ganji ZF, Sepahian N, Malmasi AA, Gouya MM, Djadid ND. *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. Infect.Genet.Evol. 2010; 10:273-277.

Zuerner RL, Alt DP, Palmer MV, Thacker TC, Olsen SC. A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. Clin.Vaccine Immunol. 2011; 18:684-691.

VIII. ANHANG TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabelle A 1: Lokalisation und Funktion einiger OMPs und anderer Membran-assoziiierter Proteine

| Lokalisation an der Membran und Bezeichnung | | Funktion | Referenz |
|---|--------|--|---|
| außen | LPS | <ul style="list-style-type: none"> • Aufbau ähnlich gramnegativer Bakterien • besteht aus dem Lipid A, dem Core und dem O-Antigen • Einteilung der Serovare basiert auf Variationen der Zuckerketten des O-Antigens • das LPS ist im rfb Lokus kodiert • das LPS fehlt wirtsgebundenen Spirochäten wie <i>B. burgdorferi</i> oder <i>T. pallidum</i> • daher wird die Expression des LPS mit der Überlebensfähigkeit in der Umwelt assoziiert | { (CULLEN et al., 2004); (HAAKE et al., 2010) |
| | LipL32 | <ul style="list-style-type: none"> • Synonym heamolysis associated protein 1 (HAP1) • major outer membrane protein (MOMP) • LipL32 macht 75 % der exprimierten Proteine aus • hochkonserviert bei pathogenen Stämmen • 96,4 % Sequenzhomologie bei pathogenen Serovaren • kann <i>in vitro</i> Fibronectin, Kollagen, Laminin und Plasmafibronektin binden • Immunogen, nicht relevant für die Pathogenität • LipL32 negative Mutanten sind im Tiermodell virulent und besiedeln die Nierentubuli • eventuell essentiell für das Überleben in der Umwelt | { (HAAKE et al., 2000); (KO et al., 2009); (HAAKE et al., 2010); |
| | LipL21 | <ul style="list-style-type: none"> • nach LipL32 das zweit häufigste Lipoprotein • wird nur bei pathogenen Leptospiren während einer Infektion exprimiert • 96 % bis 100 % Sequenzhomologien bei verschiedenen Leptospirenstämmen • Immunogen | (CULLEN et al., 2003) |
| | LipL36 | <ul style="list-style-type: none"> • nur <i>in vitro</i> in der log Phase stark exprimiert, nimmt in der mittleren log-Phase ab • wird bei einer Infektion nicht an der Zelloberfläche exprimiert • Funktion nicht bekannt • eventuell ein Mechanismus um im Wirt persistieren zu können | { (HAAKE et al., 1998); (MATSUNAGA et al., 2007); |

Tabelle A1: Fortsetzung

| Lokalisation an der Membran und Bezeichnung | | Funktion | Referenz |
|---|--------------|--|--|
| außen | LipL46 | <ul style="list-style-type: none"> nur bei pathogenen Stämmen wurde im Blut von akut infizierten Hamstern nachgewiesen Immunogen kann in der akuten Infektionsphase in den Glomerula und in der Leber nachgewiesen werden | (MATSUNAGA et al., 2006); |
| | Len Proteine | <ul style="list-style-type: none"> leptospiral endostatin-like lipoprotein binden an Bestandteile der Membran und der extrazellulären Matrix im Wirtsgewebe Len A bis F kommen nur bei pathogenen Spezies vor binden an Laminin, Fibronektin und Proteine die das Komplementsystem regulieren weisen große Sequenzunterschiede auf was auf unterschiedliche Funktionen schließen lässt wichtig für die Invasion und die Kolonisierung des Wirtsgewebes | { (STEVENSON et al., 2007); (HAAKE et al., 2010); |
| | Lig Proteine | <ul style="list-style-type: none"> leptospiral immunoglobulin-like repeat proteins Lig A bis C sind bekannt und kommen nur bei pathogenen Arten vor LigA und LigB werden bei erhöhter Osmolarität <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> exprimiert LigA wird bei erhöhter Osmolarität in den Extrazellularraum abgegeben sind Adhesine, binden <i>in vitro</i> an Proteine der extrazellulären Matrix und an Fibrinogen gelten als Virulenzfaktoren | { (CHOY et al., 2007); (KO et al., 2009) |
| | OmpL37 | <ul style="list-style-type: none"> konserviert bei pathogenen Stämmen Immunogen bindet an verschiedene Proteine des Wirtsgewebes bindet zusätzlich an das Elastin der Aorta und an die Haut Funktion nicht bekannt. eventuell wichtig für die Invasivität durch die Haut und Blutgefäße | (PINNE et al., 2010) |
| trans-membranös | OmpL1 | <ul style="list-style-type: none"> Trimer mit Epitopen und transmembranösen Anteilen fungiert temperaturabhängig als Porin nur bei pathogenen Arten hoch konserviert | { (SHANG et al., 1995);(CULLEN et al., 2003); |

Tabelle A1: Fortsetzung

| Lokalisation an der Membran und Bezeichnung | | Funktion | Referenz |
|---|---------------|---|--|
| trans-membranös | Loa22 | <ul style="list-style-type: none"> • einziger Virulenzfaktor bei dem die Kochschen Postulate erfüllt sind • bei akuten Infektionen vermehrt exprimiert • sowohl bei pathogenen als auch bei apathogenen Arten • das orthologe Gen von <i>L. biflexa</i> wird unter anderen Umweltbedingungen exprimiert • Loa22-negative Mutanten sind im Tiermodell avirulent | { (RISTOW et al., 2007); (KO et al., 2009) (CINCO, 2010); (HAAKE et al., 2010); |
| | LruA/ LruB | <ul style="list-style-type: none"> • kommen nur bei pathogenen Serovaren vor • hohe IgM- und IgA-Antikörperspiegel gegen LruA und LruB im Glaskörper aber nicht im Serum von Pferden mit ERU nachgewiesen • eventuell bei der Entstehung der ERU beteiligt | (VERMA et al., 2005) |
| | LipL31 | <ul style="list-style-type: none"> • einziges Lipoprotein, das an der inneren Membran lokalisiert ist | (HAAKE et al., 2002) |

Material und Methoden

Tabelle A 2: Überblick über die durchgeführten Teilprojekte am ¹Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie der LMU München und dem ²Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) Oberschleißheim

| Teilprojekt | Arbeitsschritte | Institut |
|--|--|----------------|
| A) Etablierung des Extraktionsprotokolls und Erstellung von Referenzspektren | <ul style="list-style-type: none"> durchgeführt mit BfR-Stämmen (Anhang Tabelle A3) Etablierung eines Protokolls für die Extraktion von <i>Leptospira</i> spp. Erstellung von Referenzspektren mit extrahierten Leptospirenproben Evaluierung der erstellten Datenbank mit extrahierten, direkt geschmierten, automatisch und manuell gemessenen Proben | 1 |
| B) Etablierung des Extraktionsprotokolls und Erstellung von Referenzspektren | <ul style="list-style-type: none"> durchgeführt mit KIT- und DSMZ-Stämmen (Tabelle A3) Etablierung eines Protokolls für die Extraktion von <i>Leptospira</i> spp. Erstellung von Referenzspektren mit extrahierten Leptospirenproben Evaluierung der erstellten Datenbank | 2 |
| C) Einfluss der Präparationsmethode und Alter der Kulturen auf die Proteinspektren | <ul style="list-style-type: none"> Evaluierung möglicher störender Einflüsse des EMJH-Mediums auf die Spektrengenerierung Festlegung der benötigten Mindestdichte durch Anlegen einer Verdünnungsreihe von einer sieben Tage alten Kultur von <i>L. interrogans</i> Serovar Autumnalis. Anschließend Messungen mit extrahierten und nicht extrahierten Proben Einfluss des Alters der Kulturen auf die benötigten Mindestdichte durch Anlegen einer Verdünnungsreihe von 19 Tage alten Kulturen der Serovare <i>L. borgpetersenii</i> Serovar Sejroe und <i>L. interrogans</i> Serovar Hardjo | 1 |
| D) Vergleich der Extraktionsprotokolle und erstellten Datenbanken | <ul style="list-style-type: none"> Vergleich der erstellten Referenzspektren beider Institute Einfluss der optionalen Schritte der Extraktionsprotokolle auf die Qualität der Spektren | 1 und 2 |
| E) Messung von Feldisolaten und 16S-rRNA-Sequenzierung | <ul style="list-style-type: none"> Abgleich von 16 Feldisolaten mit der erstellten Datenbank Überprüfung der Referenzstämme und Feldisolate mittels 16S-rRNA-Sequenzierung Sequenzierung der 16S rRNA für die DMSZ- und KIT-Stämme (Tabelle A3) | 2 |
| F) Anwendung der Software ClinProTools | <ul style="list-style-type: none"> statistische Analyse der Referenzspektren der Genospezies <i>L. interrogans</i>, <i>L. borgpetersenii</i> und <i>L. kirschneri</i> beider Institute mit der Software ClinProTools | 2 |
| G) Auswertung der ClinProTools-Daten | <ul style="list-style-type: none"> Interpretation und Erstellung der Abbildungen der ClinProTools-Daten | 1 und 2 |
| H) Visueller Vergleich der Proteinspektren | <ul style="list-style-type: none"> Gegenüberstellung der für die Erstellung von Referenzspektren verwendeten Proteinspektren der Genospezies <i>L. interrogans</i>/<i>L. kirschneri</i> und <i>L. borgpetersenii</i> der BfR-Stämme (Tabelle A3) zur visuellen Detektion differenzierender Proteinpeaks | 1 |
| I) MLST-Analyse | <ul style="list-style-type: none"> Komplette MLST Analyse aller BfR- DSMZ- und KIT-Stämme Erstellung phylogenetischer Stammbäume aller sechs analysierten Gene | 1 |

Tabelle A 3: Verwendete Stämme von *Leptospira* spp.

| Genospezies | Serogruppe | Serovar | Stamm | Pathogenität |
|--------------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|--------------|
| <i>L. interrogans</i> | australis | Australis | ^{a, b} Ballico | pathogen |
| <i>L. interrogans</i> | australis | Bratislava | ^{a, b} Jez Bratislava | pathogen |
| <i>L. interrogans</i> | autumnalis | Autumnalis | ^{a, b} Akiyami A | pathogen |
| <i>L. interrogans</i> | bataviae | Bataviae | ^{a, b} Swart | pathogen |
| <i>L. interrogans</i> | canicola | Canicola | ^{a, b} Hond Utrecht IV | pathogen |
| <i>L. interrogans</i> | hebdomadis | Hebdomadis | ^{a, b} Hebdomadis | pathogen |
| <i>L. interrogans</i> | icterohaemorrhagiae | Copenhageni | ^{a, b} M 20 | pathogen |
| <i>L. interrogans</i> | icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | ^b Ictero I | pathogen |
| <i>L. interrogans</i> | pomona | Pomona | ^{a, b} Pomona | pathogen |
| <i>L. interrogans</i> | pyrogenes | Pyrogenes | ^{a, b} Salinem | pathogen |
| <i>L. interrogans</i> | sejroe | Hardjo | ^{a, b} Hardjoprajitno | pathogen |
| <i>L. kirschneri</i> | grippotyphosa | Grippotyphosa | ^{a, b} Moskva V. | pathogen |
| <i>L. borgpetersenii</i> | sejroe | Saxkoebing | ^{a, b} Mus 24 | pathogen |
| <i>L. borgpetersenii</i> | ballum | Ballum | ^{a, b} Mus 127 | pathogen |
| <i>L. borgpetersenii</i> | sejroe | Sejroe | ^{a, b} M 84 | pathogen |
| <i>L. borgpetersenii</i> | tarassovi | Tarassovi | ^{a, b} Perepelitsin | pathogen |
| <i>L. borgpetersenii</i> | javanica | Javanica | ^b Veldrat Bataviae 46 | pathogen |
| <i>L. alexanderi</i> | nicht definiert | Manhao 3 | ^c L60 | pathogen |
| <i>L. weilii</i> | nicht definiert | Celledoni | ^c Celledoni | pathogen |
| <i>L. santarosai</i> | nicht definiert | Shermani | ^c LT 821 | pathogen |
| <i>L. noguchii</i> | nicht definiert | Panama | ^c CZ 214 | pathogen |
| <i>L. broomii</i> | nicht definiert | nicht definiert | ^c 5399 | intermediär |
| <i>L. fainei</i> | nicht definiert | Hurstbridge | ^c BUT 6 | intermediär |
| <i>L. inadai</i> | nicht definiert | Lyme | ^c 10 | intermediär |
| <i>L. biflexa</i> | Semaranga | Patoc | ^c PatocI | apathogen |
| <i>L. meyeri</i> | nicht definiert | Semaranga | ^c Veldrat S173 | apathogen |
| <i>Turneriella parva</i> | nicht definiert | Parva | ^c H | apathogen |
| <i>Leptonema illini</i> | nicht definiert | Illini | ^c 3055 | apathogen |

^a Bezogen vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

^b Royal Tropical Institute (KIT), National Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Department of Biomedical Research, Amsterdam, The Netherlands

^c Bezogen vom Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

Tabelle A 4: Verwendete Primersequenzen für das MLST

| Primer | Sequenz (5'-3') | Länge | TM (°C) | Stockkonzentration pmol/μl | Produktlänge in bp |
|-------------------|--------------------------|-------|---------|----------------------------|--------------------|
| <i>adk</i> -F | GGGCTGGAAAAGGTACACAA | 20 | 58 | 100 | 531 |
| <i>adk</i> -R | ACGCAAGCTCCTTTTGAATC | 20 | 56 | 100 | 531 |
| <i>icdA</i> -F | GGGACGAGATGACCAGGAT | 19 | 59 | 100 | 674 |
| <i>icdA</i> -R | TTTTTTGAGATCCGCAGCTTT | 21 | 55 | 100 | 674 |
| <i>LipL 41</i> -F | TAGGAAATTGCGCAGCTACA | 20 | 56 | 100 | 520 |
| <i>LipL 41</i> -R | GCATCGAGAGGAATTAACATCA | 22 | 58 | 100 | 520 |
| <i>rrs 2</i> -F | CATGCAAGTCAAGCGGAGTA | 20 | 58 | 100 | 541 |
| <i>rrs 2</i> -R | AGTTGAGCCCCGCAGTTTTC | 19 | 57 | 100 | 541 |
| <i>sec Y</i> -F | ATGCCGATCATTTTTGCTTC | 20 | 54 | 100 | 549 |
| <i>sec Y</i> -R | CCGTCCCTTAATTTTGACTTCTTC | 25 | 63 | 100 | 549 |
| <i>LipL 32</i> -F | ATCTCCGTTGCACTCTTTGC | 20 | 58 | 100 | 474 |
| <i>LipL 32</i> -R | ACCATCATCATCATCGTCCA | 20 | 56 | 100 | 474 |

TM: melting temperature **F:** forward; **R:** reverse;

Die Abkürzungen der Gene stehen für folgende Namen:

***adk*:** Adenylat Kinase; ***icdA*:** Isozitat Dehydrogenase; ***LipL*:** Outermembrane Lipoprotein; ***rrs2*:** 16S rRNA; ***secY*:** translocase preprotein secY;

ANHANG ABBILDUNGEN

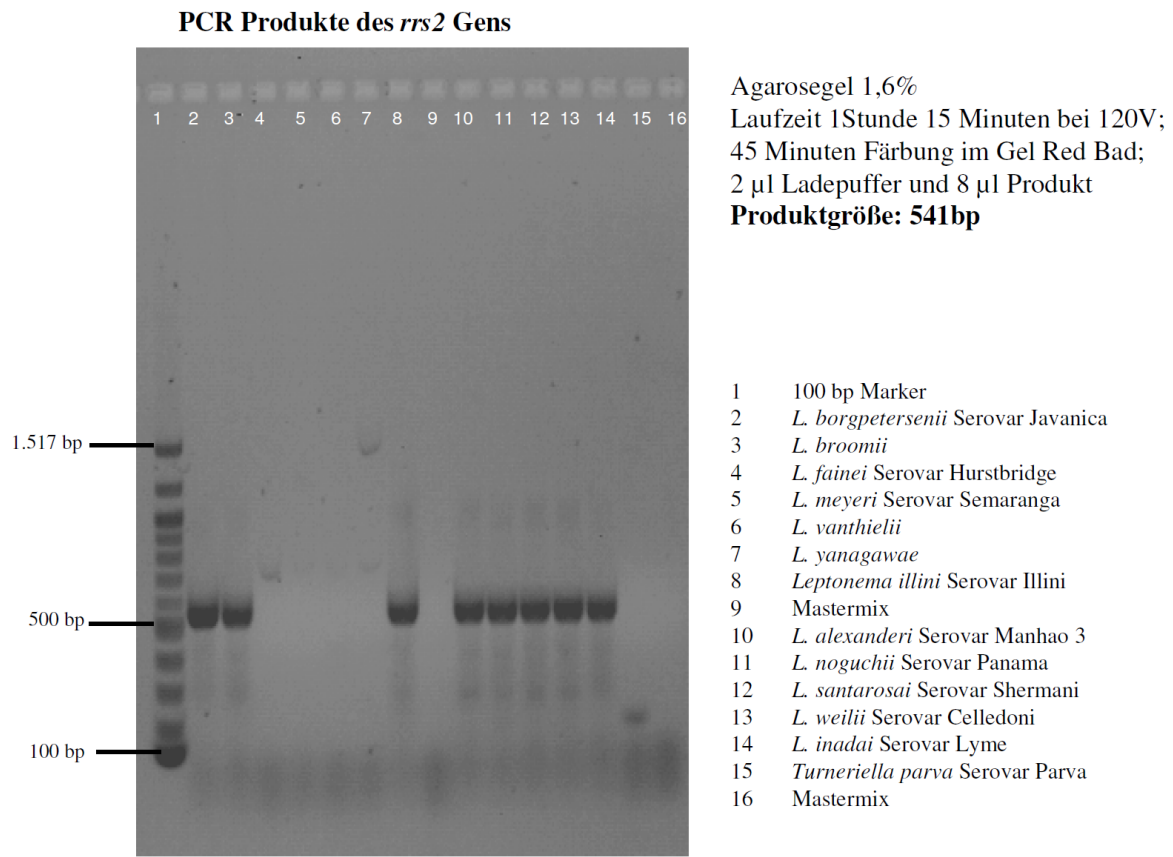


Abbildung A 1: Agarosegel der PCR-Produkte für das *rrs2*-Gen

Das Gel visualisiert die fehlenden Produkte der DSMZ Stämme (Tabelle A3) für das Gen der 16S rRNA.

IX. DANKSAGUNG

Mein besonderer persönlicher Dank gilt Herrn Prof. Straubinger für die Bereitstellung des interessanten und anspruchsvollen Themas sowie für die sehr gute Betreuung der Doktorarbeit. Seine große Bereitschaft und sein fachliches Engagement jederzeit Fragestellungen zu beantworten sowie sein Vertrauen, das er in all seine Doktoranden setzt, eigenständige Ideen und Herangehensweisen an eine wissenschaftliche Fragestellung entwickeln zu dürfen, haben mich immer wieder sehr motiviert.

Bei Inke und Viktor möchte ich mich neben der sehr guten fachlichen Betreuung meiner Doktorarbeit vor allem auch für die vielen freundschaftlichen Gespräche und so manche aufmunternden Worte bedanken, die einige schwarze Momente, insbesondere während zermürender und anstrengender Zeiten, gar nicht mehr so schwarz aussehen ließen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner gesamten Arbeitsgruppe und den Doktoranden des Institutes für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit die wir miteinander hatten.

Danke an alle Autoren des Papers, insbesondere den Kooperationspartnern des LGL, die für das Gelingen der Publikation beigetragen haben.

Bei meiner ganzen Familie möchte ich mich für Ihre Unterstützung und Ihr Verständnis bedanken, die sie mir während des gesamten Studiums und der Doktorarbeit entgegengebracht haben. In diesem Zusammenhang gilt mein größter Dank meinen Eltern. Ohne euer Vertrauen, euer Verständnis und vor allem ohne den Rückhalt, den Ihr mir immer entgegenbringt, wäre diese Arbeit wohl nie so möglich gewesen.

Bei meinen Freunden, vor allem Johanna, Friedericke, Steffi, Tine und Michi möchte ich mich bedanken, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten und dass ich während der ganzen Zeit auf sie zählen konnte, auch wenn die knapp bemessene Zeit so manch geplantes Treffen zunichte gemacht hat. Tom, ich danke dir dafür, dass du mir in anstrengenden Zeiten eine Insel der Ruhe bietest und ich immer auf deine Unterstützung zählen kann.